



Landbrugsafdelingen. Årsberetning 1989

Forskningscenter Risø, Roskilde

Publication date:
1990

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Forskningscenter Risø, R. (1990). *Landbrugsafdelingen. Årsberetning 1989*. Risø National Laboratory. Risø-M No. 2854

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

DK 40000 TV

RISØ

Risø-M-2854

Landbrugsafdelingen Årsberetning 1989

Forskningscenter Risø, 4000 Roskilde, Danmark
Januar 1990

Landbrugsafdelingen Årsberetning 1989

Risø-M-2854

*Risø National Laboratory, DK-4000 Roskilde, Denmark
Januar 1990*

Abstract. Årsberetningen indledes med en generel omtale af afdelingens forskningsarbejde. Årets aktiviteter er beskrevet i korte projektberetninger efterfulgt af publikations- og foredragslister. Årsberetningen indeholder desuden en oversigt over personale, gæsteforskere og studerende og afsluttes med 3 oversigtsartikler om udvalgte emner fra afdelingens arbejde omhandlende: "Kitinase i byg og raps", "Symbiotisk kvælstofbinding" og "Biologisk bekæmpelse af meldug".

ISBN 87-550-1619-7
ISSN 0418-6435
ISSN 0903-7829

Grafisk Service Risø 1990

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
1. Indledning	5
2. Genetik og molekylærbiologi	6
2.1. Molekylærbiologi	6
2.2. Cellekultur	9
2.3. Genetik og resistensbiologi	11
3. Plantecmæring og miljø	18
3.1. Indledning	18
4. Andre faglige aktiviteter	24
5. Øvrige aktiviteter	24
5.1. Seminarer	24
5.2. Rejser og studieophold i udlandet	25
6. Personale, gæsteforskere og studerende	26
6.1. Personale	26
6.2. Gæsteforskere	27
6.3. Studerende	27
7. Udvalgte emner	27
7.1. Kitinase i byg og raps	27
7.2. Symbiotisk kvælstofbinding	30
7.3. Biologisk bekæmpelse af meldug	35

1. INDLEDNING

Årsberetningen giver en kortfattet rapport over resultater fra de enkelte projekter, som er grupperet i to projektområder omfattende henholdsvis **Genetik og molekylærbiologi** samt **Planteernæring og miljø**. Derefter følger oplysninger om andre faglige aktiviteter og om personale, gæsteforskere og studerende. Beretningen afsluttes med tre artikler om udvalgte emner.

Arbejdet inden for **genetik og molekylærbiologi** skal bidrage til at frembringe grundlæggende og anvendelsesorienteret viden om kulturplanterne. Desuden udvikles metoder og teknikker til anvendelse i genetiske analyser og i planteforædlingen. Der lægges vægt på undersøgelser over kulturplanternes kvalitet og deres resistens/modtagelighed over for angreb af patogene svampe, og der søges udviklet metoder til transformation og regeneration fra cellekultur af byg.

En væsentlig del af afdelingens arbejde vedrørende genetik og molekylærbiologi er tilknyttet Biotechnologisk Center for Planter (BCP), som nu har fungeret i 2 år. Landbrugsafdelingens faglige baggrund for at deltage i det biotechnologiske forskningsprogram er mange års erfaring med klassisk, plantegenetisk forskning. Denne forskning har bidraget til at frembringe viden om kulturplanternes genetik, til udvikling af metoder og teknikker til anvendelse i den praktiske planteforædling, og til at frembringe planter med ønskede egenskaber. Med udviklingen af de molekylær-genetiske metoder åbnedes nye muligheder for at ændre planternes arvelige egenskaber og opnå øget indsigt i det arvelige grundlag for økonomisk vigtige egenskaber hos kulturplanterne. I 1983-84 blev der foretaget en analyse af Risøs forudsætninger for at deltage i biotechnologisk forskning. Som resultat heraf blev det besluttet, at Risøs forskning på dette område skulle sigte mod udvikling og anvendelse af molekylærbiologiske metoder inden for planteforædling og plantedyrkning. Dette arbejde er yderligere blevet styrket med

bevillingen fra det biotechnologiske forsknings- og udviklingsprogram. Deltagelse i BCP har desuden bidraget væsentligt til et intensiveret og frugtbart samarbejde mellem forsknings- og forædlingsinstitutter.

Der er etableret tættere kontakt med danske planteforædlere via Planteforædlernes Fælles Forsknings- og Undervisningsudvalg (PFFU), som repræsenterer samtlige danske planteforædlingsvirksomheder. Ved et møde på Risø orienteredes PFFU om afdelingens forskningsarbejde, og der blev aftalt nærmere samarbejde om forskningsprojekter af fælles interesse vedrørende nye resistensgener mod meldug i byg (projekt 2.3.5.) og vedrørende anvendelse af restriktions-fragment-længde-polymorfi (RFLP) som markører til selektion for kvantitative egenskaber i byg (projekt 2.1.13. og 2.3.4.). Sidstnævnte projekt søges koordineret med tilsvarende undersøgelser i de øvrige nordiske lande samt i EF og USA. Endvidere er der i samarbejde med planteforædlerne gennemført et litteraturstudium for at vurdere, om der er behov for yderligere undersøgelser vedrørende kromosomfordobling af inducerede haploider, som i stigende omfang anvendes i planteforædlingen.

Arbejdet vedrørende **planteernæring og miljø** omfatter grundlæggende undersøgelser over plantenæringsstoffers omsætning og transport i jord-plante-atmosfæresystemet. Der lægges især vægt på at undersøge muligheder for effektivisering af planternes optagelse af kvælstof og fosfor og hermed begrænse risikoen for forurening af det omgivende miljø. Dette arbejde koordineres med andre danske aktiviteter på området via et SJVF-initiativ om: "Mikrobielle processer i rodzonen i relation til planternes forsyning med næringsstoffer". Afdelingen deltager endvidere i et fælles Risø-projekt om dannelse, transport, deponering og omsætning af kvælstofilter, der dannes ved forbrænding.

Der er nu taget beslutning om, at en del af Danmarks Miljø-Undersøgelser (DMU)

skal placeres på Risø. Dette medfører, at de såkaldte "Open-Top Chambers" (OTC), som anvendes i undersøgelser over planternes optagelse af forurening fra atmosfæren, skal flyttes for at give plads for nybyggeri. I den anledning er der indgået aftale mellem DMU, Institut for Økologisk Botanik, Københavns Universitet (KU) og Risø om placering og fælles udnyttelse af disse faciliteter.

I lighed med tidligere år har studerende fra Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (KVL) og KU gennemført hoved- og specialopgaver på afdelingen. Endvidere gennemføres der på afdelingen i samarbejde med de højere læreanstalter 9 licentiatprojekter, som finansieres af Forskerakademiet/Risø, BCP, SJVF og kandidatstipendium fra KVL. (Arna Andersen).

2. GENETIK OG MOLEKYLÆRBIOLOGI

Arbejdet har som formål at frembringe grundlæggende og anvendelsesorienteret viden om kulturplanternes genetik, at etablere metoder og teknik til anvendelse i planteforædling, og at frembringe planter med gener for ønskede egenskaber. Molekylærgenetiske metoder udvikles og anvendes sammen med konventionelle genetiske analyser i undersøgelser af kulturplanternes udbytte og kvalitet samt deres resistens/modtagelighed over for angreb af patogene svampe.

2.1. Molekylærbiologi

Afdelingens molekylærbiologiske arbejde omfatter undersøgelser af mulighederne for at udnytte nye teknikker og transformation i planteforædlingen. Forskningen centrerer om sygdomsresistens, proteinkvalitet og genkortlægning ved hjælp af RFLP analyser.

Bygmeldugsvampen undersøges med det formål at identificere og karakterisere gener med betydning for svampens angrebsevne. Kendskab til den biokemiske mekanisme, der ligger til grund for spillet mellem svamp og plante vil danne grundlag for en vurdering af mulighederne for at fremstille permanent resistente bygplanter.

Betydningen af de hydrolytiske enzymer kitinase og 1,3- β -glucanase som

afværge mekanisme mod svampeangreb i byg og raps vurderes. Ligeledes undersøges glucan-syntasens betydning for kallosedannelse i Mlo resistente byglinier.

Både blad- og endosperm-bygperoxidaser er blevet klonet, og betydningen af disse enzymer i resistensøjemed og som lagerproteiner vurderes. Mulighederne for at forøge mængden af bygendosperm lagerprotein, protein Z ved genetisk transformation undersøges.

Byggens genom kortlægges detaljeret ved hjælp af RFLP-markører, og det vurderes, hvordan disse kan bruges til selektion for kvantitative egenskaber.

2.1.1. Plasmider i meldug

Meldugsvampen indeholder ekstrakromosomalt plasmidlignende DNA. Analyser af afkom fra enkelte cleistothecier har vist, at plasmidet overvejende nedarves cytoplasmatisk. Dette er understøttet af, at den mitokondrielle DNA-fraktion fra melduginficerede bygblade indeholder plasmidet. Lincære mitokondrielle plasmider er fundet i flere patogene svampe. Hele plasmidet er nu klonet, og vi undersøger ved sekventering, hvor stor lighed der er mellem melduggens plasmid og de tidligere publicerede svampeplasmider. I isolater, der indeholder plasmid, er der fundet dobbeltstrengt RNA. Plasmidets basesammensætning vil vise, om det indeholder viruslignende sekvenser. (Henriette Giese).

2.1.2. RFLP-analyser af meldug

Med restriktions fragment længde polymorfi (RFLP)-teknikken kan forskelle i individers DNA-basesekvens afsløres. Disse forskelle kan bruges som genetiske markører, såkaldte RFLP-markører.

RFLP-markører har vist sig at være meget effektive til at karakterisere meldugisolater. Med kun tre RFLP-markører kan 28 isolater adskilles på deres DNA-båndmønstre.

Der er etableret effektive teknikker til udvalg af RFLP-markører, der kan bruges i koblingsanalyser. Afkomsisolater fra en krydsning mellem to meldugisolater er analyseret for nedarvning af 31 RFLP- og 5 virulensloci. Resultatet af koblingsanalysen viser, at der findes 7 koblingsgrupper, hvoraf 2 indeholder både RFLP- og virulensloci. (Solveig Krogh Christiansen og Henriette Giese).

2.1.3. Identifikation og karakterisering af meldug-DNA, der udtrykkes tidligt i infektionsforløbet

Et cosmidbibliotek over genomisk DNA fra bygmeldug er blevet undersøgt for sekvenser, der transskriberes tidligt i infektionsforløbet. Ved brug af radioaktivt mærket mRNA fra melduginficerede bygblade er der i biblioteket fundet 29 DNA-sekvenser, der udtrykkes 14 timer efter smitte. En subkloning af disse sekvenser i en mindre vektor er påbegyndt.

Med henblik på at undersøge det tidsmæssige forløb af sekvensernes transskription er der oprenset mRNA fra bygblade høstet med to timers intervaller efter meldugsmitte. Dette mRNA er overført til filtre, som senere skal hybridiseres til de subklonede sekvenser. Oplysninger om sekvensernes udtryksmønster kan forhåbentligt være udvalgs-kriterium for, hvilke sekvenser der skal undersøges yderligere. (Lone Rossen og Merete Rasmussen).

2.1.4. Kitinase og kitinbindende proteiner i bygblade

Kitinaser bidrager til planters forsvar imod svampe ved at nedbryde kitin i svampes cellevægge. Ved meldugangreb stiger kitinaseaktiviteten i resistente og modtagelige bygblade 2-4 gange. For at karakterisere kitinaser fra bygblade er 6 kitinbindende proteiner oprenset fra meldug-inficeret byg ved affinitets- og ionbytningskromatografi. Et af dem er identificeret som en basisk endokitinase på 36 kD. Aminosyresekvensen af tryptiske peptider af dette enzym fra bygblade viser stor homologi til to kitinaser fra bygkerner og til kitinaser fra andre planter. Endokitinasen har antifungal aktivitet, idet den kan hæmme hyfevæksten af *Trichoderma viride* på agarplader. Fire af de andre kitinbindende proteiner har kun meget lave kitinase-aktiviteter i forhold til endokitinasen. Alligevel tyder foreløbige resultater på, at tre af dem har antifungal aktivitet i lighed med endokitinasen. (Karsten M. Kragh).

2.1.5. Kitinase og 1,3- β -glucanase fra byg-cellesuspensioner

En kitinase og en 1,3- β -glucanase er blandt de proteiner, der akkumuleres i næringsmedier af byg-cellesuspensionskulturer (projekt 2.2.3.). De er blevet oprenset ved affinitets- og ionbytningskromatografi samt reverse phase HPLC. Den oprensede kitinase og 1,3- β -glucanase har en størrelse på henholdsvis 36 og 33 kD. Der er fremstillet polyklonale antistoffer imod 1,3- β -glucanasen. Kitinasen og 1,3- β -glucanasen sammenlignes med tilsvarende enzymer fra blade og kerner af byg for at afgøre, om de kun udtrykkes i *in vitro*-kulturer. Kitinasen fra suspensionerne er større end kitinaser fra bygblade, men på størrelse med én, som syntetiseres i bygkerner under embryoudviklingen og spiringen. (Karsten M. Kragh og Kirsten Nielsen).

2.1.6. Sygdomsresistens i raps

Der er blevet etableret infektionssystemer med henholdsvis *Cylindrosporium concentricum*, *Sclerotinia sclerotiorum* og *Phoma lingam*. Kitinase har vist sig at blive induceret kraftigt i planter inficeret med ovennævnte svampe. En undersøgelse af *Phoma lingam* inficerede kimblade af sor-

ten 'Bicavenue' har yderligere vist, at kitinase induceres umiddelbart efter infektionen og stiger kraftigt inden for en periode af 8 dage. Kitinase bliver ikke induceret systemisk.

Kitinase er blevet delvis oprenset. Mindst syv isoenzymer med en molekylvægt på 14-38 kD er til stede i inficerede blade. Det polypeptid, som induceres kraftigst i forbindelse med et svampeangreb, har molekylvægten 30 kD. Det har vist sig, at dette polypeptid ikke induceres af ethylen, og at den ethylen-inducerede kitinase (molekylvægt 38 kD) ikke induceres ved et svampeangreb. Dette arbejde er udført i samarbejde med Dr G. Selvarage, Saskatoon, Canada.

mRNA fra inficerede planter er isoleret og brugt til konstruktion af et cDNA-bibliotek. Kitinasekloner udvælges nu fra dette bibliotek. (Ulla Rasmussen).

2.1.7. Kalloshedannelse og 1,3- β -glucansynthetaseaktivitet i byg ml-o mutanter
Dannelsen af sårhelingskallose (1,3- β -glucan) i epidermisceller som respons på meldugangreb undersøges i dette projekt. Kallosesynteseraten er ens i ml-o mutanter og modersorter, der ikke inokuleres med meldug. Tyve timer efter inokulation er synteschastighederne fortsat lige store i ml-o mutanter og modersorter, men er reduceret til 50% af værdierne ved tiden 0.

Den plasmamembranbundne kallose-synthetase (1,3- β -glucansynthetase) er frigjort fra membranen med detergentet CHAPS og karakteriseret kinetisk. Det frigjorte enzym er søgt oprenset ved hjælp af en såkaldt produktindfangningsteknik og affinitetskromatografi. (Lars H. Pedersen).

2.1.8. cDNA for bygperoxidaser

De molekylærbiologiske metoder er anvendt for at opnå en bedre forståelse af peroxidaseres rolle under udviklingen af bygplanten og deres betydning i plantens reaktion mod patogene organismer. Første trin er fremstilling af cDNA kloner for bygperoxidase. Disse anvendes som prober til analyse af genexpression, genisolering (2.1.9.) og produktion af peroxidaseenzy-

met (2.1.10.). I projektet indgår et samarbejde med Afdelingen for Biokemi og Ernæring (DTH) omkring proteinoprensning og antistoffremstilling og Institut for Biokemisk Genetik (KU) omkring aminosyreskventering og biokemisk karakterisering af peroxidase-enzymet.

To peroxidase cDNA-kloner er isoleret, og nukleotidsekvensen for disse er bestemt. Den ene, pcR7, koder for BP1-peroxidase, som kun findes i bygendospermen. Den anden cDNA klon, pcD1311, koder for en bygperoxidase, som kun bliver udtrykt i bygbladene. Analyse af RNA isoleret fra bygblade til forskellige tider efter melduginokulering af bladene viser, at transskription af pcD1311 peroxidasegenet forstærkes. (Søren Rasmussen).

2.1.9. Gener for bygperoxidase

De strukturelle gener for bygperoxidaser ønskes kortlagt ved nukleotid sekvensbestemmelse, således at regulerende sekvenser kan analyseres for fx vævsspecificitet og inducerbarhed. Dette vil danne grundlag for konstruktion af vektorer til genetisk transformation.

Med cDNA-klonerne pcR7 og pcD1311 som prober er i alt 3.200.000 kloner fra to forskellige genomiske byg-DNA biblioteker undersøgt for peroxidasegener, og seks af de påviste kloner er oprenset til renhed. Analyse med tre forskellige restriktionsenzymer viser, at disse seks kloner er forskellige og derfor kan være kloner af 6 forskellige peroxidasegener. Den genomiske klon, W7422, hybridiserer under høj stringens til pcR7, men ikke til pcD1311. På grundlag af restriktionsanalyse af det 18 kb klonede byg-DNA fragment i W7422 kan peroxidasegenet lokaliseres til midten af et 7,8 kb Bam H1 restriktionsfragment. Dette er tilstrækkeligt til at kode for den 1,4 kb lange peroxidase-RNA, intron og regulerende sekvenser. Indledende nukleotidsekvensanalyse af Bam H1-fragmentet bekræfter, at den genomiske klon indeholder en sekvens, der svarer til peroxidase-

cDNA'en pcR7. (Bodil Theilade og Søren Rasmussen).

2.1.10. Produktion af bygperoxidase i en mikroorganisme

Ved gensplejsning ønskes konstrueret en *E. coli*/ger-stamme, som kan producere bygperoxidase i tilstrækkelig mængde til biokemisk analyse. Substratspecifiteten, den specifikke aktivitet og varmestabiliteten kan herefter ændres ved hjælp af *in vitro* fremstillede punktmutationer. Dette vil indgå i vurderingen af en eventuel kommerciel produktion af peroxidase.

Først fremstilles en komplet cDNA-klon for BP1-bygperoxidasen ved hjælp af cDNA-klonen pcR7, som indeholder halvdelen af den 1,4 kb lange RNA for BP1. Klonen er blevet koblet til Sephacryl-matrix, hvorpå BP1-RNA kan opfanges. Den derved berigede BP1-RNA anvendes til cDNA-syntese. (Anette Johansson og Søren Rasmussen).

2.1.11. Genet for protein Z

I byg findes der lysinrige proteiner, som kan erstatte nogle af de lysinfattige lagerproteiner. Et af disse er protein Z, som dannes under kernedykningen samtidigt med lagerproteinene. Ved hjælp af genetisk transformation af byg ønskes mængden af proteinet øget. Derfor må gener for protein Z klones med henblik på karakterisering af struktur og regulerende sekvenser.

Genet *paz4* beliggende på bygkromosom 4, og genet *paz7* på kromosom 7 koder for protein Z. Ved hjælp af en cDNA-klon for *paz7* er en genomisk klon, W5114, oprenset til renhed. Genet ligger på et 2,7 kb langt Bam HI-restriktionsfragment, som i øjeblikket bliver nukleotidsekvensbestemt. (Søren Rasmussen).

2.1.12. RFLP-analyser af byg

Der søges efter RFLP-markører, der kobler til QTL (quantitative trait loci); ideelt skulle 20 RFLP-markører dække hvert af byggens 7 kromosomer.

Genomisk byg-DNA er klonet i pUC12 ved hjælp af Bam HI og PstI restriktions-

enzymet. Femten Bam HI-kloner ud af 70 blev fundet ikke repetitive. Seks af dem blev undersøgt for egnethed som prober til påvisning af polymorfi. To prober repræsenterer mellemrepetitive sekvenser, fire prober enkeltkopi sekvenser. Alle seks er uegnede til RFLP-analyse, da de ikke påviser forskelle i båndmønstre mellem de forskellige bygsorter.

Blandt 185 PstI-kloner er ca. 90% ikke repetitive. Nitten af dem er blevet undersøgt som prober. To repræsenterer repetitive sekvenser, otte mellemrepetitive, fire lavrepetitive og fem enkeltkopi-sekvenser. Tre ud af de otte mellemrepetitive kloner giver tydelig forskel i båndmønstre og er godt egnede til analyser af afkom for nedarvning af RFLP-markører. (Dvora Berenstein).

DNA fra 80 fordoblede haploide afkomslinier fra krydsningen mellem 'Vogelsanger Gold' og 'Alf' er isoleret. Med henblik på at lokaliserer lævigatum mældugresistensgenet er analyse for spaltningen af 4 af vores egne PstI RFLP-markører og 14 RFLP-markører fra Mike Gale i England i denne krydsning påbegyndt. Denne analyse vil også vise, om disse markører kan bruges i et tilbagekrydsningsprogram.

Selektionen af egnede RFLP-markører fra vores genomiske PstI bygbibliotek er nu indarbejdet, så der rutinemæssigt kan undersøges 8 potentielle RFLP-markører om ugen. (Henriette Giese).

2.2. Cellekultur

Arbejdet med cellekulturer er koncentreret om regeneration af bygplanter fra enkeltceller via embryogenese, dvs. på en måde, der svarer til kimudviklingen i bygkernen. Forståelse af genreguleringen under embryo- og plantedannelse søges belyst ved biokemiske undersøgelser af somatisk og zygotisk embryogenese.

2.2.1. Mikrospore- og støvknapkultur

I mikrosporekultur, hvor mikrosporene er isoleret fra støvknapvævet før kulturens

start, er der regenereret grønne planter fra hybrider mellem fem vinterbygssorter. Antallet af grønne regeneranter fra hybridene var lavt (2 grønne planter/aks) sammenlignet med modelsorten 'Igni' (98 grønne planter/aks). Mikrosporekultur af vårbygssorterne 'Triumph', 'Sabatis' samt vinterbygssorten 'Mariaka' har endnu ikke givet planter, men proembryoner/mikrocalli udvikles i en tredjedel af de initierede kulturer.

I flydende støvknækultur og i mikrosporekultur er det fundet, at en øget lufttilgang til cellerne giver et større antal embryoner. Lufttilgangen forbedres ved brug af meget små mediemængder eller hydrofobe filtre.

En undersøgelse af forbehandlingsindflydelse på regenerationen fra støvknækulturer af 'Igni' har vist, at der ikke var forskel på antallet af grønne regeneranter fra kontrolaks (ikke forbehandlet) og aks forbehandlet ved 4°C eller i 0,3M mannitol.

For sorten 'Igni' er afkom af 168 regeneranter fra støvknækultur og 43 regeneranter fra mikrosporekultur udlagt i markforsøg. Morfologiske afvigere blandt afkommet fra støvknæk- og mikrosporekulturer udgjorde henholdsvis 10% og 20%. Autotetraploidi var den hyppigste form for variation. (Rikke Bagger Jørgensen og Else Toftdahl Larsen).



Et 3 uger gammelt embryo udviklet fra en mikrospore i cellekultur.

2.2.2. Suspensions- og protoplastkultur

Suspensionskulturer af sorterne 'Golden Promise', 'Dissa' og 'Igri', der er etableret fra umodne zygotiske embryoer og proembryoer fra mikrosprekulturer, har efter 1½ år i kultur stadig embryoens kapacitet. Ved en ny regenerationsmetode dannes suspensionerne somatiske embryoer på hydrofobe filtre i flydende næringssubstrat. Tidligere kunne embryogenesen kun finde sted på fast substrat. Antallet af embryoer er ens ved de to metoder. Den nye metode tillader analyse af proteiner udskilt til næringssubstratet under embryogenesen (Kirsten Nielsen).

Suspensionerne anvendes desuden til isolering af protoplaster. Protoplasterne kan dele sig og danne embryogent kallus, hvorfra der kan regenereres små skud. Det er vist, at protoplasternes delingsfrekvens kan øges ved tilføjelse af konditioneret medium fra en non-embryogen suspension. To forskellige vektorer med genet for betaglucuronidase (GUS) er indsat i protoplasterne og genexpressionen målt fluorometrisk 2-4 døgn efter indsættelsen. (Rikke Bagger Jørgensen).

2.2.3. Anatomisk karakterisering af embryogenesen

Visuelt kan der være store ligheder mellem den naturlige embryodannelse og embryoudviklingen fra enkeltceller i kultur. I et samarbejde med Kirsten Engell, KU, er der foretaget anatomiske undersøgelser af somatiske embryoer fra støvnap og mikrosprekulturer. Det har kunnet fastslås, at alle cellerne i et somatisk embryo kan deltage i embryodannelsen, og at det vel-differentierede somatiske embryo ofte ikke kan adskilles anatomisk fra zygotiske embryoer. (Else Toftdahl Larsen).

2.2.4. Biokemisk karakterisering af embryogenesen

I næringssubstratet af embryogene og non-embryogene suspensioner akkumuleres der på 7 dage 200 µg protein/mg medium. Endimensional elektroforese af disse proteiner viser, at båndmønstret (50 bånd) er ens for embryogene og non-embryogene

suspensioner, når de dyrkes som udifferentierede aggregater. Alle bånd er til stede tidligt i vækstfasen. Forskellige koncentrationer af hormonet 2,4-D i substratet ændrer ikke proteinmønstret. Under differentiering (somatisk embryodannelse på hydrofobe filtre) er der fundet ændret proteinmønstre, idet to nye bånd dukker op, mens andre forsvinder.

Proteinerne identificeres ved oprensning og aktivitets-assays samt ved hjælp af antistof-krydsreaktioner. To proteiner, kitinase og 1,3-β-glucanase, er oprenset til homogenitet, mens peroxidase er delvis oprenset. Antistof mod embryospecifikke proteiner fra gulerodssuspensioner kryds-reageres med proteiner fra bygsuspensioner. (Kirsten Nielsen og Karsten Kragh).

2.2.5. Embryospecifikt protein

Det tidligere identificerede embryospecifikke protein er blevet yderligere karakteriseret. Det findes i flere cerealer og græsser, og der er udviklet en kvantitativ analysemetode for det. Proteinets indeholder ikke kulhydrat, og det optræder i to hovedformer med meget forskellige molekylvægte og isoelektriske punkter. Det minder dermed om "barley (eller wheat) germ agglutinin", som det dog er klart forskelligt fra både med hensyn til immunologisk specificitet og placering af pletterne i to-dimensional elektroforese.

Ved to-dimensional elektroforese ses stor forskel på proteinmønstret af mikrosporer og af unge somatiske/zygotiske embryoer. Der er imidlertid ingen forskel på proteinerne fra de zygotiske og de somatiske embryoer. Zygotiske embryoer fra 15 dage efter anthesis til modenhed viser karakteristiske, kvantitative ændringer, men næppe fremkomst af nye proteiner. Heller ikke i de forstørrede embryoer i høj-lysin mutanter er der fundet afvigende proteinmønstre. (Ole Schou og Bertel Køie).

2.3. Genetik og resistensbiologi

Planteformidlingen fremskaffer, bearbejder og udnytter arvelig variation i kulturplan-

terne med henblik på at udvikle nye sorter med højt udbytte, god kvalitet og resistens mod plantesygdomme. Kvalitetssegenskaberne kan være af dyrkningsmæssig, teknisk eller ernæringsmæssig art, medens resistens mod plantesygdomme bidrager til høje, stabile udbytter og reduceret pesticidforbrug. En af forudsætningerne for effektiv planteforædling er viden om de gener, der betinger de ønskede egenskaber, genernes placering på kromosomerne, kromosomernes opbygning og genetisk rekombination. Der lægges især vægt på byggenes genetik, på at etablere metoder og teknik til planteforædling, og på at tilvejebringe planter med gener for de ønskede egenskaber.

2.3.1. Kromosomundersøgelser

Båndfarvning af de 31 arter i bygslægten med sine 50 underarter og kromosomtalsvarianter viste, at arterne kan opstilles i fire grupper efter håndmønstre, hvoraf den ene gruppe omfatter arter fra flere taksonomiske sektioner. Det sætter spørgsmålstegn ved den biologiske relevans af den hidtidige inddeling. På grundlag af båndfarvningen, kombineret med iagttagelser af markør-kromosomer, har det været muligt at udarbejde slægtskabsforhold for 16 Syd- og Centralamerikanske bygarter, af hvilke adskillige af de polyploide krydservilligt med dyrket byg. Kromosombesætningen hos nogle hybrider og tilbagekrydsninger mellem disse og dyrket byg viste, at der er et vist håb om, at det ad denne vej vil være muligt at overføre egenskaber fra vild byg til dyrket byg. Nogle hybrider kan tabe eller få (ekstra) kromosomer. Talsmønstret er undersøgt i en hybridkombination, hvor det afveg markant fra, hvad der tidligere er iagttaget. Der er udarbejdet båndfarvede karyotyper af nogle vilde græsarter fra slægter, der er nært beslægtet med byg. Indarbejdelsen af teknikken til *in situ* hybridisering er fortsat. Det har ikke været muligt at lokalisere et gen, der ad anden vej vides kun at findes i et lavt antal kopier på et kromosom. (Ib Linde-Laursen).

2.3.2. Duplikation af locus for protein Z i byg

Med henblik på at forbedre kvaliteten af bygternes protein og samtidig bevare et højt kernerudbytte, forsøger vi at indbygge en ekstra kopi af det kromosomsegment, der koder for det lysinrige protein Z i lagerprotein. Metoden, vi vil anvende, bygger på anvendelse af reciprokke translokationer med specifik beliggenhed af brudpunkterne på kromosomerne. Før duplikationen af kromosomsegmentet med genet for protein Z kan udføres, har det været nødvendigt at lokalisere positionen af genet for protein Z og positionerne af brudpunkterne hos en lang række translokationer. Dette arbejde er ved at være afsluttet, og vi søger nu at fremstille linier med de ønskede duplikationer. (Jens Jensen).

2.3.3. Nye højlysin mutanter i byg

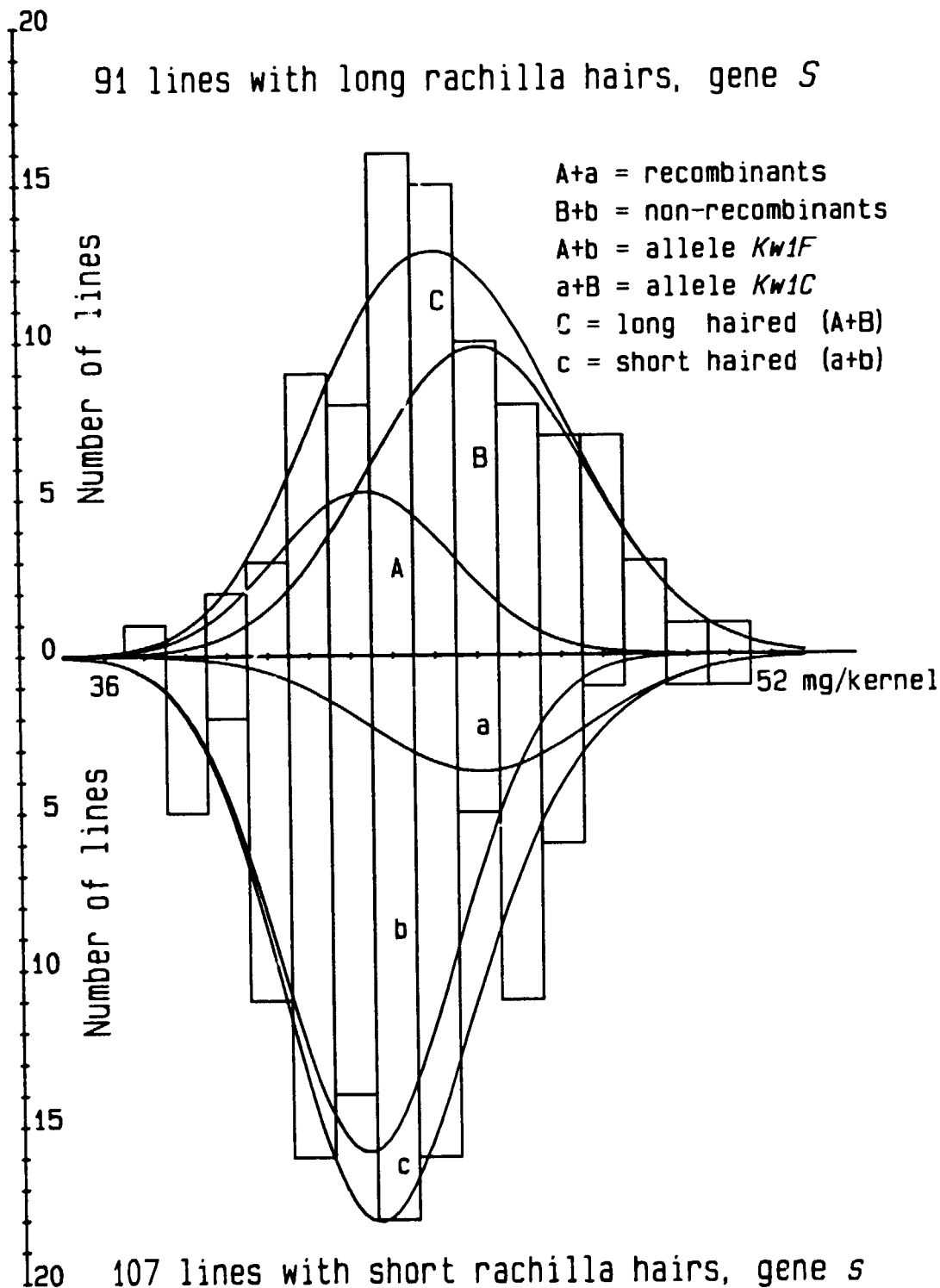
Udbyttet af otte nye højlysin mutanter er blevet verificeret i endnu et udbytteforsøg. Fem mutanter havde lavere udbytte end udgangssorten 'Sultan', medens udbyttet af de tre ikke afveg signifikant herfra. Det afviser den generelle opfattelse, at højlysin mutanter altid har et betragteligt mindre udbytte end udgangssorten. (Jens Jensen).

2.3.4. Lokalisering af QTL på byggenes kromosomer

Med henblik på at lokalisere gener for kvantitative egenskaber, de såkaldte QTL (quantitative trait loci), har kromosomfordoblede haploide linier fra to krydsninger været udsat i marken i et udbytteforsøg. Foruden udbytte bestemmes en række andre kvantitative egenskaber. Baseret på en række markørgener og på RFLP (restriction fragment length polymorphism), forsøger vi at kortlægge gener for kvantitative egenskaber på kromosomerne. Projektet udføres i samarbejde med korforædlingsvirksomhederne. (Jens Jensen).

2.3.5. Nye meldagræsistensgener

Næsten 400 nye linier og populationer af almindelig byg (*Hordeum vulgare*) og af krydsninger mellem dyrket og vild byg (*Hordeum spontaneum*) fra Sydvestasien



Histogrammerne på figuren viser sammenhængen mellem spaltningen for genet *s*, der betinger den morfologiske egenskab "korthåret bygstilk" (short rachilla hair) og den kvantitative egenskab "gennemsnitsvægt af en bygkerne". De kontinuerte kurver illustrerer vores model, der forklarer sammenhængen som en genetisk kobling mellem et QTL (quantitative trait locus) for kernerøgt, her benævnt *Kw1*, og genet *s*.

og Etiopien er i 1989 afprøvet for meldugresistens i markforsøg. De 32 mest resistente linier blev udtaget til gentagne afprøvninger. Der er iværksat et samarbejdsprojekt imellem Risø og de danske komforædlingsvirksomheder med henblik på at undersøge hvor mange forskellige og nye meldugresistensgener, der er i disse linier, samt at overføre resistensen til bygmaterialer, der er egnede til dyrkning i Danmark. (J. Helms Jørgensen).

2.3.6. Mlo-aggressivitet i bygmeldug-svampen

I 1988 blev der indsamlet 102 bygmeldug-isolater fra modtagelig og Mlo-resistent byg på Sjælland. Disse isolater er undersøgt for Mlo-aggressivitet, dvs. den relative evne til at angribe Mlo-resistent byg. Aggressiviteten blev målt som synlige meldugkolonier på primære bygblade i procent af tilførte, spirede meldugsporer. Et normalt, ikke-aggressivt isolat, GE3, og et Mlo-aggressivt isolat, HL3/5, er brugt som kontrol. Ingen af de 102 indsamlede isolater var Mlo-aggressive. I et forsøg med udvalgte isolater og med et forøget antal gentagelser, kunne der ikke fastslås nogen variation for Mlo-aggressivitet blandt de indsamlede isolater.

Udspaltningsforsøg for Mlo-aggressivitet i krydsningsafkom mellem det Mlo-aggressive isolat HL3/5 og ikke-aggressiv meldug er blevet undersøgt. Kun et enkelt afkomsisolat ud af 30 havde en påviselig forøget Mlo-aggressivitet, hvilket tyder på, at Mlo-aggressivitet er polygent betinget. Ved måling af meldugkoloniernes væksthastighed og sporeproduktionens størrelse er det ved at blive belyst, om Mlo-aggressivitet medfører en nedsat "fitness" på byg uden Mlo-resistens. Der er endvidere arbejdet med at udvikle en praktisk anvendelig metode til fremtidige monitoringsundersøgelser for Mlo-aggressivitet. (Lars Andersen og J. Helms Jørgensen).

2.3.7. Resistens mod stribesyge

Nedarvningsforholdene for resistens mod stribesyge undersøges i en halv snes højre-

sistente bygsorter, der ikke er beslægtede med de 'Vada'-resistente sorter. Sorterne er krydset til den 'Vada'-resistente sort 'Zita' og til den stærkt modtagelige linie 'CI 6944'. 'Vada'-resistensen er betinget af et enkelt gen, og det findes på det samme kromosom som genet *Ml-(La)* for resistens mod meldug. Genets kromosomale beliggenhed undersøges nærmere i en population af fordoblede monoploider fra krydsningen 'Vogelsanger Gold' x 'Alf'. Undersøgelser i samarbejde med Plantevæmscentret over virkningen af resistens og afsvampning på smittet, resistent 'Golf'- og modtagelig 'Triumph' byg har på tre forsøgsstationer i 1989 i gennemsnit givet et merudbytte for afsvampning på henholdsvis -0,2 hkg og 7,8 hkg pr. ha.

I Danmark afsvampes mere end 90% af udsæden af byg. Vores påvisning af fuld resistens og forskellige niveauer af partiel resistens har ført til argumentation for, at afsvampning efter behov vil være praktisk realisabel, hvis den baseres på en karakterisering af sorternes resistensniveau. Det hører med i denne argumentation, at talrige danske forsøg har vist, at afsvampning af sund såsæd hyppigt medfører et udbyttetab. På den baggrund er der gennemført en række forsøg for at belyse, om den fytotoksiske virkning kan påvises ved spiring på bomuldsfilter og i jord i drivhus. De opnåede resultater viser, at afsvampningsmidlerne har fytotoksisk virkning på kimplantestadiet, og bekræfter dermed risikoen for udbyttetab ved afsvampning af sund udsæd. (V. Haahr og J.P. Skou).

2.3.8. Biologisk bekæmpelse af meldug

Der er gennemført forsøg med bekæmpelse af byg- og agurkemeldug ved hjælp af svampen *Tilletiopsis albescens*. Resultaterne beskrives mere udførligt i oversigtsartikel, side 35.

Forsøg med bekæmpelse af agurkemeldug i små vækstvamre under høj relativ luftfugtighed har vist op til 99% reduktion i antallet af meldugkolonier ved to inokuleringer med *Tilletiopsis*, og lavt meldugsmittetryk. Under dyrkningsforhold som i

et væksthushagartneri, er der udført forsøg i væksthushus med konstant høj relativ luftfugtighed. Inokuleringen med *Tilletiopsis* forårsagede lavere dækningsgrad med meldug og en lavere konidieproduktion. Forsøg med agurkeblade under reguleret luftfugtighed har vist, at *Tilletiopsis*-svampen kræver mindst 70% relativ luftfugtighed for at udvikle en stabil tæt population på bladene.

Et markforsøg med bekæmpelse af bygmeldug har vist, at bekæmpelse af meldug kunne kun måles ved opsamling af meldugkonidier, og kun i parceller, hvor *Tilletiopsis*-væksten var fremmet ved vanding først på sæsonen. Der er arbejdet med at fastlægge, hvilke mekanisme(r) der er virksomme ved bekæmpelsen. Forsøg med meldug på bygblade med og uden *Tilletiopsis* viste ingen hæmning af bygmeldugkonidiernes spiring, der kunne tilskrives antibiose. Derimod har mikroskopi og iagttagelse af bekæmpelsesmønstret antydnet, at der er tale om reel hyperparasitisme. (Inge M.B. Knudsen og J.P. Skou).

2.3.9. Virulensgener i meldugsvampen

Fra det tjekkoslovakiske institut for sortsafprøvning har vi fået en henvendelse om, ved hjælp af vores meldugisolatsamling med mange kendte virulensgener, at analysere 4 nye vinterbygsorter for meldugresistens. To nye resistenstyper, der er forskellige fra hidtidige kendte resistensgener, blev påvist.

"Laevigatum" meldugresistensgenet *MI-(La)* er koblet med et gen for stribesyggeresistens, men de to gener er endnu ikke lokaliseret til kromosom. Kobling er derfor undersøgt til yderligere 7 isoenzymmarkører. Ingen af disse viste imidlertid kobling med *MI-(La)*. I samme krydsningsmateriale (CI 6944 x 'Zita') viste meldugresistensgenet *MI-h* kobling til isoenzymgenet *Acp3* på kromosom 6.

Mulig sammenhæng mellem virulensgener og forekomst af plasmidlignende DNA er undersøgt i ca. 30 isolater fra vores samling og i to forskellige afkomshold fra krydsning mellem isolater. Der

kunne ikke påvises sammenhæng mellem virulensgenerne og forekomst af plasmid. Undersøgelser af nyindsamlede meldugpopulationer for virulens, fungicidresistens og plasmid er i gang. Den ene population består af 60 isolater, der er udtaget repræsentativt i den danske meldug i 1989, og den anden består af ca. 40 tyske isolater, der er udvalgt, fordi de har forskellig grad af fungicidresistens. (Henriette Giese, H.P. Jensen og J. Helms Jørgensen).

Publikationer

Andersen, Lars, 1989: Aggressiveness of powdery mildew on Mlo resistant barley. (Abstract). - Proc. Science for Plant Breeding. XII EUCARPIA Congress, Göttingen. Vorträge für Pflanzenzüchtung 15(1).

Andersen, Lars, 1989: Overvågning af Mlo aggressivitet. - Nordisk Planteværnskonference 1989: 79-86.

Baden, C., I. Linde-Laursen and D.R. Dewey: A new Chinese species of *Psathyrostachys* (Poaceae) with notes on its karyotype. - Nord. J. Bot. (under trykning).

Bothmer, R. von, J. Flink, N. Jacobsen, and R.B. Jørgensen, 1989: Variation and differentiation in *Hordeum maritimum* (Poaceae). - Nord. J. Bot. 9: 1-10.

Bothmer, R. von, L. Cläesson, J. Flink and I. Linde-Laursen, 1989: Triple hybridization with cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) - Theor. Appl. Genet. 78: 818-824.

Bothmer, Roland von and Ib Linde-Laursen, 1989: Backcrosses to cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) and partial elimination of alien chromosomes. - Hereditas 11: 145-147.

Christiansen, S.K. and V. Smedegaard: Microscopic studies of the interaction between barley and the saprophytic fungus *Cladosporium macrocarpum*. - Journal of Phytopathology (under trykning).

Doll, Hans, 1988: Characteristics of quality in seeds storing carbohydrates. - Proc. XI EUCARPIA Congress Quality in Plant Breeding, Warszawa, Polen: 45-50.

Doll, Hans, 1989: Genteknologi i landbrugets planter. - Alt det nyeste 1990, Jordbrugsforlaget, København: 9-14.

Doll, Hans and Rex N. Oram, 1989: Deviating Mendelian segregation of barley gene *hys 3a*. - Hereditas 110: 97-99.

Doll, Hans, Vagner Haahr and Bodil Søgaard, 1989: Relationship between vernalization requirement and winter hardiness in doubled haploids of barley. - Euphytica 42: 209-213.

Giese, H. og S.K. Rasmussen, 1989: Tæt på meldugsvampen. - Riso Nyt nr. 4: 2-3.

- Giese, H., S.K. Christiansen and H.P. Jensen, 1990: Extrachromosomal plasmid-like DNA in the obligate parasitic fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. - Theor. Appl. Genet. 79: 56-64.
- Haahr, V., J.P. Skou, and H.P. Jensen, 1989: Inheritance of resistance to barley leaf stripe (*Drechslera graminiae*). (Abstract). - Proc. Science for Plant Breeding, XII EUCARPIA Congress, Göttingen, 1989. Vorträge für Pflanzenzüchtung 15(1). 2 p.
- Jensen, J., 1989: Genetical localization of QTL (quantitative trait loci). - Proc. Science for Plant Breeding, XII EUCARPIA Congress, Göttingen, 1989. Vorträge für Pflanzenzüchtung 15-1, 3/5.
- Jensen, Jens, 1988: Coordinator's report: Chromosome 5. - Barley Genetics Newsletter Vol. 18: 61-63.
- Jensen, J., 1989: Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. - Theor. Appl. Genet. 89: 613-618.
- Jørgensen, J. Helms, 1988: Coordinator's report: Disease and pest resistance genes. - Barley Genetics Newsletter Vol. 18: 65-69.
- Jørgensen, J. Helms, 1989: Naturvidenskab, bioteknologi og global fødevarerproduktion i det næste århundrede - en kommentar. - Miljøværn 22: 23-27.
- Jørgensen, J. Helms, 1989: Resistente bygsorter, sortsblandinger og/eller fungicider? - 6. Danske Planteværnskonference 1989. Sygdomme og skadedyr: 159-171.
- Jørgensen, J. Helms and H.P. Jensen: Effect of "unnecessary" powdery mildew resistance genes on agronomic properties of spring barley. - Norsk Landbrugsforskning (under trykning)
- Jørgensen, J. Helms, 1989: Kan resistente sorter erstatte fungicider i bygdyrkningen? - Nordisk Planteværnskonference 1989: 65-71.
- Jørgensen, R.B. and B. Andersen, 1989: Karyotype analysis of regenerated plants from callus cultures of interspecific hybrids of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). - Theor. Appl. Genet. 77: 343-351.
- Kjær, B., H.P. Jensen, J. Jensen and J. Helms Jørgensen: Associations between three *ml-o* powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley. - Euphytica (under trykning)
- Knudsen, Inge M.B., 1989: Biologisk bekæmpelse af meldeg med *Tilletiopsis albescens*. - Nordisk Planteværnskonference 1989: 89-95.
- Knudsen, Inge M.B.: Biocontrol of barley powdery mildew. (Abstract). - Symposium on New Directions in Biological Control, Colorado, USA, 20.-27. januar. J. Cell Biochem. Suppl. 13A: 175.
- Linde-Laursen, I. and S. Frederiksen, 1989: Giemsa C-banded karyotypes of three subspecies of *Taeniatherum caput-medusae* and of two intergeneric hybrids with *Pseudostachys* spp. (Poaceae). - Hereditas 110: 283-288.
- Linde-Laursen, I., R. von Bothmer, and N. Jacobsen, 1989: Giemsa C-banded karyotypes of South American *Hordeum* (Poaceae). I. 14 diploid taxa. - Hereditas 110: 289-305.
- Linde-Laursen, I., R. von Bothmer, and N. Jacobsen, 1989: Giemsa C-banded karyotypes of *Hordeum marinum* and *H. murinum*. - Genome 32: 629-639.
- Linde-Laursen, I. and R. von Bothmer, 1989: Allocyclic and nucleolar dominance in *Hordeum* x *Secale* amphiploid somatic metaphases. - Hereditas 111: 85-86.
- Linde-Laursen, I., R. von Bothmer and N. Jacobsen: Giemsa C-banded karyotypes of South and Central American *Hordeum* (Poaceae). II. 6 polyploid taxa. - Hereditas 112 (under trykning)
- Linde-Laursen, I., R. von Bothmer and N. Jacobsen: Giemsa C-banded karyotypes of diploid and tetraploid *Hordeum bulbosum* L. (Poaceae). - Pl. Syst. Evol. (under trykning)
- Nielsen, Kirsten A.: Polyamin content in relation to embryo growth and dedifferentiation in barley (*Hordeum vulgare* L.). - Journal of Experimental Botany (under trykning)
- Rasmussen, U., L. Munck and S.E. Ullrich: Immunogold localization of chymotrypsin inhibitor, a lysine-rich protein, in developing endosperm. - Planta (under trykning).
- Sandfær, Jens, 1989: Dyrkning af byg og hvede i blanding. - Risø-I-431, 19 p.
- Schou, Ole, 1989: Raising monoclonal antibodies against plasma membranes from barley embryos. - In: 5th Intern. Conference on Phase Partition, Oxford, 1987 "Separations using aqueous phase systems" (eds Derek Fischer and Ian A. Sutherlands): 61-62.
- Schulz, R., K. Steinmüller, M. Klaas, C. Forreiter, S.K. Rasmussen, C. Miller and K. Apel, 1989: Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*. - Mol. Gen. Genet. 217: 355-361.
- Seberg, O., S. Frederiksen, C. Baden and I. Linde-Laursen: The generic status and relationships of *Festucopsis* and *Peridictyon* gen. nov. (Poaceae). - Willdenowia (under trykning)
- Skou, J.P. (ed.), 1989: Meddelelser fra Plantepatologisk Nomenklaturudvalg (ISSN 0900-5102) nr. 11, 4 s.
- Skou, J.P., 1989: Svampeslægten *Gloeosporium* forkastet. - Medd. Plantepat. Selskab 11: 2-4.
- Skou, J.P., 1989: Fytotoksisk virkning af afsvampningsmidler. - Nordisk Planteværnskonference 1989: 47-56.
- Skou, J.P. and V. Haahr, 1988: Inheritance of resistance to barley leaf stripe. - Barley Genetics Newsletter Vol. 18: 50-52.
- Skou, J.P. & Sv. Nørgård 'Iolm, 1989 *Ascoaphaera tenax* species nova and a variant of *Ascoaphaera aggregata*. - Mycotaxon 35: 211-218.
- Skou, J.P., V. Haahr, and J. Helms Jørgensen, 1989: Afsvampning og resistens mod frøbørne sygdomme i vår-

byg. - 6. Danske Planteværnskonference 1989. Sygdomme og skadedyr: 173-181.

Posters

Hansen, J.S., D. Funck Jensen and I.M.B. Knudsen: - Biological control of cucumber powdery mildew with the fungus *Tilletiopsis minor*. Symposium on: New Directions in Biological Control, Colorado, USA, 20.-27. januar.

Knudsen, Inge M.B.: Biocontrol of barley powdery mildew. - Symposium on New Directions in Biological Control, Colorado, USA, 20.-27. januar.

Køie, B., R. Lührs, L.H. Pedersen og O. Schou: Embryo-specific Proteins in *Hordeum*: Electrophoretic and Immunological Analyses. - Årsmøde i Bioteknologisk Center for Planter, Klarskovgård, 30.-31. januar.

Larsen, E.T., K. Engell, R. Rajagopal og R.B. Jørgensen: Celle- og vævskultur som hjælp i planteforædlingsprogrammer. - FTU-seminar, 30.-31. august.

Lührs, Renate og Kirsten A. Nielsen: Bygsuspension. - Årsmøde i Bioteknologisk Center for Planter, Klarskovgård, 30.-31. januar.

Nielsen, Kirsten A., Ina Hansen og Karsten M. Kragh: Karakterisering af extracellulære proteiner fra bygsuspensionskulturer. Oprensning af chitinase og 1,3- β -glucanase. - Biokemisk Årsmøde, Ebeltoft, 27.-28. oktober.

Rasmussen, S.K.: Molekylærgenetiske studier af peroxidaser i byg. - Årsmøde i Bioteknologisk Center for Planter, Klarskovgaard, 30.-31. januar.

Rasmussen, S.K., B. Theilade, K.G. Welinder og J. Hejgaard: Kloning af gener for bygperoxidaser. - Biokemisk Forenings Årsmøde, Fuglsøcentret, 27.-28. oktober.

Rossen, L. S.K. Christiansen and H. Giese: Analysis of chromosomal and plasmid-like DNA in barley powdery mildew. - NATO workshop: "Molecular signals in microbe-plant symbiotic and pathogenic systems", Holland, 21.-25. maj.

Theilade, B., K.G. Welinder, J. Hejgaard and S.K. Rasmussen: Cloning of genes for barley peroxidase. - Fifteenth EMBL Annual Symposium on "Molecular Communication in Higher Plants", Heidelberg, FRG, 18.-21. September.

Welinder, K.G., B. Stoffer, T. Johansson, P.O. Nyman, S.K. Rasmussen and J. Hejgaard: The superfamily of peroxidases from plants, fungi and yeast. Prospects in Protein Engineering, Groningen, Holland, 14-18 August.

Foredrag

Andersen, Lars: Aggressiveness of powdery mildew on Mlo resistant barley. - Nordic Symposium on Applications of Recombinant DNA Research for Plant Disease Control, Lammi, Finland 23. - 25. oktober.

Andersen, Lars: Kan/vil Mlo resistens blive nedbrudt? - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole, 9.-10. november.

Christiansen, S.K.: Restriktionsfragment længde polymorfi analyse af bygmeldugsvampen. Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole, 9.-10. november.

Christiansen, S.K.: Undersøgelse af plantepatogene svampe med genteknologiske metoder. - Kursus i Planteforædling og Genteknologi, Tune Landboskole, 16. november.

Christiansen, S.K.: Anvendelse af RFLP i genetiske undersøgelser af *Erysiphe graminis*. - Den Kgl. Vet.- og Landbohøjskole, 3. maj.

Doll, Hans: Bioteknologiens muligheder inden for plantedyrkning. - Landsforeningen Danske Maskinstationer. Pejsegården, 2. februar.

Doll, Hans: Genteknologi i landbrugets planteproduktion. - ATV-møde, KVL, 10. maj.

Doll, Hans: Gensplejsning i planter. - Efterårsmøde for planteavlskonsulenter, Hotel Nyborg Strand, 3. oktober.

Doll, Hans: Bioteknologisk Center for Planter. - Debatmøde om centermodellen, KVL, 9. oktober.

Giese, H.: Plasmider i meldugsvampen. - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole, 9.-10. november.

Giese, H.: Anvendelse af restriktions fragment længde polymorfi til studier af obligate parasitter. - Plantepatologisk Selskab, 16. november.

Haahr, V.: Resistensforædling mod Stribesygge. - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole, 9.-10. november.

Jensen, Hans Peter: Nedarvning af virulens i bygmeldug. - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole 9.-10. november.

Jørgensen, Jørgen Helms: Virulensgener i meldugsvampen. - Møde på Statens Forsøgsstation Tystofte, 23. maj.

Jørgensen, Jørgen Helms: Resistente bygsorter og/eller fungicider. - Plantepatologisk Selskab, KVL, 30. maj.

Jørgensen, Jørgen Helms: Mutational analysis of powdery mildew resistance genes in barley. - Nordisk Symposium "Applications of recombinant DNA research for plant disease control", Lammi, Finland 23.-25. oktober.

Jørgensen, Jørgen Helms: Resistens mod bladplet i byg. - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole 9.-10. november.

Jørgensen, Jørgen Helms: Resistensforædling. - Fem forelæsninger for agronomstuderende, KVL, 7., 10., 20., 21. og 24. november.

Jørgensen, Rikke Bagger: Microspore culture and transformation in barley. - Sveriges Lantbruksuniversitet, 25. april.

Jørgensen, Rikke Bagger: Gensplejsningsmetoder i komarter. - ATV-møde: Genteknologi i landbrug og skovbrug, 10. maj.

Jørgensen, Rikke Bagger: Celle- og vævskultur. Teknikker og anvendelsesmuligheder. - "Planteforædling og genetik", Tune Landboskole, 14. november.

Knudsen, Inge M.B.: Biologisk bekæmpelse af meldug med *Tilletiopsis*. - Seminar på Plantepatologisk Institut, Den Kgl. Vet- og Landbohøjskole, 4. april.

Kragh, Karsten M.: Meldug på og kitinase i byg. - Danisco A/S, 10. februar.

Kragh, Karsten M.: Chitinase in barley leaves: induction, purification and characterization. - Nordisk Symposium "Applications of Recombinant DNA Research for Plant Disease Control", Lammi, Finland, 23.-25. oktober.

Kragh, Karsten M.: Kitinase i bygblade. - Seminar: Resistensforædling i Danmark, Tune Landboskole, 9.-10. november.

Kragh, Karsten M.: Kitinase og 1,3- β -glucanase i planters forsvar imod fytopatogene svampe. - Plantepatologisk Selskab, KVL, 16. november.

Linde-Laurson, Ib: Genome and chromosome analysis in *Hordeum* and related genera using banding techniques. - Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der Akademie der Wissenschaften der DDR, Gatersleben, 23. maj.

Linde-Laurson, Ib: Research at the Agricultural Research Department of Risø National Laboratory. - Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der Akademie der Wissenschaften der DDR, Gatersleben 24. maj.

Linde-Laurson, Ib: Opponent ved Doktordisputats, Genetiska Institutionen, Lunds Universitet. (Brook Abebe: Lateral Floral development in barley as affected by mutant genes). 22. september.

Nielsen, Kirsten A.: The problem of regeneration of whole plants from cells in culture. - 15th Nordic Postgraduate

Course in Plant Breeding, Tune Landboskole, 15.-20. januar.

Nielsen, Kirsten A.: Establishment and biochemical characterization of embryogenic cell-suspensions of barley. - Nordisk Workshop: "Molekylære studier av frøudvikling hos bygg", Finse, Norge, 10.-13. september.

Pedersen, Lars H.: 1,3- β -D-Glucansynthetase aktivitet af kallosedannelse i byg *ml-o* mutanter. - Seminar: Resistensforædling i Danmark. Tune Landboskole, 9.-10. november.

Rasmussen, Merete and Lone Rossen: Fremstilling og screening af meldug-DNA-bibliotek med henblik på isolering og karakterisering af meldug-DNA, der udtrykkes på et tidligt tidspunkt i infektionsforløbet. - Seminar: Resistensforædling i Danmark. Tune Landboskole, 9.-10. november.

Rasmussen, S.K.: Cloning and identification of genes. - Samnordisk Forskerkursus i Planterforædling "Biotechnology in Plant Breeding", Tune Landboskole, 16.-20. januar.

Rasmussen, S.K.: Gensplejsning og planter. - "Plantebeholdningen i 90'erne", Tune Landboskole, 15. februar.

Rasmussen, S.K.: Expression of peroxidase genes in barley endosperm cells. - Nordic Workshop "Molecular studies of barley seed development", Finse, Norge, 11.-13. september.

Rasmussen, Ulla: Lokalisering af byg endosperm protein ved hjælp af fluorescence og guldmærkede antistoffer. - Den Kgl. Vet. og Landbohøjskole, 28. februar.

Rasmussen, Ulla: Lokalisering af byg endosperm protein ved hjælp af fluorescence og guldmærkede antistoffer. - Danisco, 21. september.

Rasmussen, Ulla: Chitinase in *Brassica napus*. - Valencia, Spanien, 24. oktober.

3. PLANTEERNÆRING OG MILJØ

3.1. Indledning

Det overordnede formål med gruppens arbejde er at undersøge de grundlæggende biologiske og kemiske processer, der styrer omsætningen af plantenæringsstoffer i jord-plante-atmosfæresystemet. En del af arbejdet er knyttet til SJVF-initiativet "Mikrobielle processer i rodzonen". Under dette initiativ samarbejder seks danske forskningsinstitutioner, der undersøger forskellige områder af stofomsætningen i jorden og dermed frigørelsen og bindingen

af plantenæringsstofferne. Deltagelsen i dette initiativ har givet øgede samarbejds- muligheder med de andre institutioner. Vore undersøgelser omhandler symbiotisk binding, omsætning og tab af kvælstof ved dyrkning af ærter og efterafgrøder, samt betydningen af VA-mycorrhiza for plan- ternes næringsstofforsyning.

Vi har indgået en EF-finansieret sam- arbejdskontrakt med The Rubber Institute of Malaysia om et forskningsprojekt ved- rørende udnyttelse af symbiotisk bundet kvælstof i blandingskulturer af bælgplanter og ikke-bælgplanter.

3.1.1. Efterafgrøder

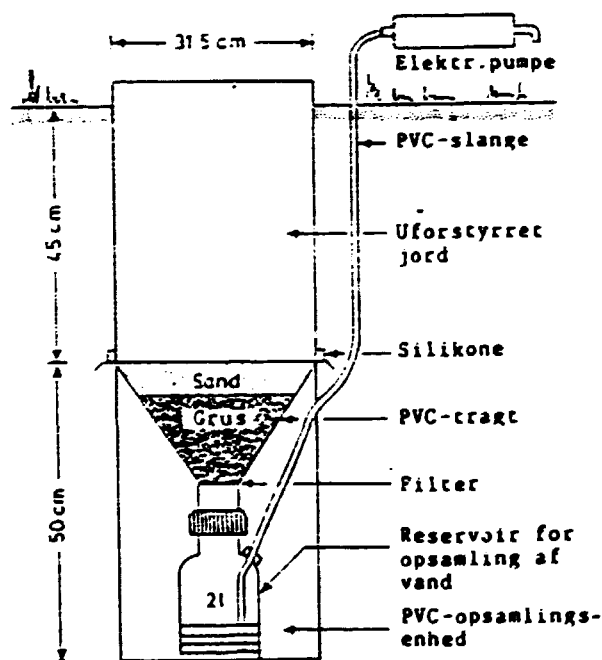
Formålet med at dyrke efterafgrøder i efterårs- og vintermånederne er at "fange" mineraliseret N og således reducere udvaskningen af kvælstof.

I markforsøg på sandblandet lerjord blev alm. rajgræs sået som efterafgrøde i dæksæd af markært og vårbyg. Gul sennep etableredes som efterafgrøde efter høst af disse afgrøder. I slutningen af november indeholdt efterafgrøderne i alt 30-60 kg N/ha i top og rod. Udbyttet af den efterfølgende vårbygafgrøde blev reduceret efter dyrkning og nedfræsning af rajgræsefterafgrøden. Der var ingen indvirkning på udbyttet af byg efter dyrkning og nedfræsning af gul sennep.

I et rammeforsøg blev ^{15}N -mærket materiale af rajgræs svarende til ca. 40 kg N/ha nedbragt i december. I den milde vinter 1987-88 og det følgende forår blev ca. 10% af det nedbragte rajgræs-N udvasket til under 45 cm's dybde. En efterfølgende vårbygafgrøde optog ca. 20% af det mærkede N. Om efteråret og frem til 1 år efter nedbringning af plantematerialet, blev

udvaskningen af mærket N beregnet til at udgøre ca. 8% af den tilførte mængde. Et år efter nedbringning fandtes 2% og 50% af det nedbragte rajgræs-N som henholdsvis uorganisk og organisk N i de øverste 10 cm jord. Der kunne ikke redegøres for 10% af det mærkede rajgræs-N efter 1 års omsætning. Dette N kan være tabt ved denitrifikation.

Resultaterne viser, at en væsentlig del af kvælstoffet i nedpløjet efterafgrødemateriale vil være tilgængeligt for en efterfølgende afgrøde. Kvælstof hidrørende fra mineralisering af jordens organiske stof fastlægges under den mikrobielle nedbrydning af plantematerialet. Disse forsøg antyder, at immobiliseringen af jord-N er større end mineraliseringen af mærket rajgræs-N ved omsætning af rajgræsmateriale om foråret. Dette indebærer, at mængden af plantetilgængeligt N om foråret er mindre efter nedfræsning af efterafgrøde, sammenlignet med ingen efterafgrøde, hvilket kan reducere udbyttet af den efterfølgende afgrøde. (Erik Steen Jensen).



Lysimeter anvendt til måling af kvælstofudvaskning i projekterne 3.1.1 og 3.1.2.

3.1.2. Omsætning af kvælstof i ærtemateriale

Efter høst af markært indeholder jorden normalt mere nitrat end efter høst af korn, og planteresterne efter en ærteafgrøde indeholder desuden mere N. Kendskab til omsætningen af dette kvælstof er vigtig for at kunne vurdere i hvor høj grad dyrkning af markært indvirker på N-tabene fra dyrket jord og for at belyse hvorledes dette kvælstof udnyttes mest effektivt i planteproduktionen.

I ramme- og lysimeterforsøg undersøges mineralisering og udvaskning af N fra ærtemateriale. Tilførsel af ^{15}N -mærket ærtehalv og -rod svarende til ca. 140 kg N/ha medførte en netto-immobilisering af N om efteråret. Den samlede udvaskning af N til under 45 cm dybde fra september til april blev reduceret med ca. 15% ved nedmuldning af ærteplanterester. I alt ca. 8% af det tilførte, mærkede N blev udvasket i denne periode.

I laboratorieforsøg undersøges mineraliseringen af N og C i ærtehalv med kvælstofkoncentrationer varierende fra 0,9 til 2,5 %. Mineraliseringen af C var positivt korreleret med kvælstofkoncentrationen i halmen. Tilførsel af ærtehalv medførte netto-immobilisering af N uafhængigt af kvælstofindholdet i halmen. Først efter 12 ugers inkubation observeredes netto-mineralisering af N ved tilførsel af halv med 2,5% N.

Resultaterne viser, at ærtemateriale, til trods for et ofte højere indhold af kvælstof end planterester fra kornafgrøder, ved nedpløjning kan give anledning til en fastlæggelse af N om efteråret. (Erik Steen Jensen).

3.1.3. Bladrandbiller i markært

Bladrandbiller (*Sitona lineatus*) er et hyppigt forekommende skadedyr i ærter. Billerne gnaver af bladene, og larverne invaderer og fortærer rodknoldene og skader herved den symbiotiske kvælstofbinding. Der er imidlertid fortsat nogen usikkerhed om betydningen af bladrandbillens skader for udbyttet af markært.

I markforsøg undersøges forekomsten af bladrandbillens larver i ærterodknolde sidst i maj. I ca. 18% af de undersøgte rodknolde forekom larver svarende til ca. 300 larver pr. m^2 .

Forsøg med bejdsning med insecticid mod bladrandbiller i ært viste, at inficeringen af rodknolde med larver i slutningen af maj blev reduceret fra 18% til ca. 5% ved bejdsning. Den ringe nedbørsmængde i vækstperioden resulterede i lave udbytter, og der blev, i modsætning til 1988, målt en udbyttereduktion på ca. 13% som følge af bejdsning af udsæden med insecticid. (Erik Steen Jensen).

3.1.4. Denitrifikation og bælgplantedyrkning

Denitrifikationshastigheden i jord bestemmes af faktorer som temperatur, nitratkoncentration, tilgængelighed af organisk stof, jordens vandindhold og bakteriesammensætning. Bælgplantedyrkning skaber andre forhold for denitrifikation i jorden end korn dyrkning, bl.a. vil antallet af rhizobiumbakterier i jorden øges. Vi har påvist, at denitrifikation er almindeligt forekommende hos *Rhizobium leguminosarum*-stammer isoleret fra Risø-jord. En *Pseudomonas chlororaphis*-bakterie denitrificerede under samme forhold med en faktor 10 højere hastighed. Agerjord indeholder, selv ved ærtedyrkning, normalt 10-100 gange så mange denitrificerende pseudomonader som *R. leguminosarum*. Det må derfor konkluderes, at *R. leguminosarum* sandsynligvis ikke bidrager væsentligt til kvælstoftabet via denitrifikation.

I efteråret 1988 blev der anlagt et ramme-forsøg i marken til sammenligning af denitrifikationens årstidsvariationer ved dyrkning af byg og ært. De foreløbige resultater viser, at der på grund af den meget tørre sommer generelt har været en meget lav denitrifikation i marken, og at der sandsynligvis ikke under disse betingelser er nogen signifikant forskel på denitrifikationen i jord dyrket med ært og med byg. Nitratkoncentrationen er imidlertid højere i ærteparcellerne, således at der

ville være mulighed for højere denitrifikation i tilfælde af større jordfugtighed.

Plantevækstens effekt på denitrifikationen studeres i pottesforsøg. Potterne kobles til et åbent flowsystem, der gør det muligt at kontrollere jordatmosfærens sammensætning (bl.a. ilt og acetylen). De første resultater tyder på, at plantevæksten har en positiv virkning på denitrifikationshastigheden, især ved høje nitratkoncentrationer. Ærter synes at have større positiv effekt på denitrifikationshastigheden end byg. (Finn Bertelsen og Erik Steen Jensen)

3.1.5. Mykorrhiza

Betydningen af vesikulær-arbuskulær mykorrhiza (VAM) for omsætning og transport af næringsstoffer i rodzonen undersøges i forbindelse med et SJVF-initiativ. Kvantitative studier af det eksterne VAM-mycelium er udført med agurk som modelplante. Der blev målt op til 27 m mycelium pr. gram tør jord, og svampehyfernes udbredelsesrate var mindst 1,5 mm pr. dag.

Organiske kulstof (C)-forbindelser udskilt fra levende rødder udgør en vigtig substratkilde for heterotrofe mikroorganismer i rhizosfæren. Dette gælder også VAM-myceliet, der forsynes med sukkerstoffer direkte fra værtplanten. Transporten af C fra rødder til VAM-mycelium og til jord er blevet målt ved hjælp af C-14 mærkningsteknik. Overjordiske plantedele indeholdt 57% af fotoassimileret ^{14}C , mens 27% blev genfundet som $^{14}\text{CO}_2$ udskilt fra rødder og mikrobiel aktivitet i jorden. Jordens indhold af organisk ^{14}C udgjorde 3,1% af fotoassimileret ^{14}C og omkring 25% heraf var lokaliseret i det eksterne VAM-mycelium.

Baseret på måling af biovolumen blev tørvægten af det eksterne mycelium beregnet til 7,5 mg pr. plante svarende til 0,5% af den samlede plantebiomasse. På baggrund af forsigtige skøn over biomassen af VAM-hyfer inde i rødderne og svampenes evne til at omsætte substrat-C til biomasse-C kunne det beregnes, at det rodeksterne og -interne VAM-mycelium havde

forbrugt henholdsvis 4 og 16% af fotoassimileret ^{14}C .

VAM-infektionen er blevet målt i ærterødder indsamlet tre uger efter fremspiring fra 16 sjællandske marker i 1988. Som et gennemsnit for de 16 marker var 43% af rodlængden inficeret. Den laveste og højeste infektionsgrad var henholdsvis 25 og 70%. En kvalitativ opdeling af infektionen i forskellige kategorier viste en klar dominans af *Glomus*-arter, især den gruppe, der udvikler hyfer med relativ stor diameter. Resultaterne sammenlignes med prøver indsamlet fra 18 ærtemarker i 1989 og søges relateret til jordbundsfaktorer og dyrkningsmæssige faktorer.

Sædskiftets betydning for VAM-udviklingen er påvist ved undersøgelse af infektionen hos porre i samarbejde med K.T. Kristensen, Institut for Grønsager, Årsløv. Omkring 70 dage efter såning blev der målt 70% VAM hos porre dyrket efter byg, men kun 40% hos porre efter hvidkål, der ikke udvikler VAM. Samtidig blev der observeret en betydeligt ringere vækst efter kål end efter byg. Identifikation af VAM-svampe fra systemforskningsarealerne på Foulum, Ødum og St. Jyndeved er fortsat. (Iver Jakobsen og J.P. Skou).

3.1.6. Mykorrhiza og omsætning af kvælstof

Det undersøges, hvilken betydning VAM har for omsætning og transport af kvælstof i rodzonen. Forsøgene indbefatter dyrkning af byg og agurk i specielle dyrkningsenheder med netskillevægge til restriktion af rodbevægelser.

Resultater fra undersøgelser af kvælstofforbindelsers mobilitet i det beskrevne dyrkningssystem viste, at tilført ammonium inden for 14 dage totalt nitrificeredes til nitrat. Det blev følgelig påvist, at det tilsatte kvælstof, uanset tilsætningsform, i form af nitrat kunne bevæge sig hen til planterødderne, om end i begrænset mængde.

Analysearbejdet er endnu ikke afsluttet, men det kan indledningsvis konstateres, at koncentrationen af nitrat i jorden er mindre i forsøgsled med VAM end i kontrolledde-

ne. Dette kan betyde, at VAM har haft en positiv indvirkning på planternes optagelse af nitrat fra jorden. (Anders Johansen og Iver Jakobsen).

3.1.7. Kvælstofbindingens fysiologi

Den symbiotiske N_2 -binding i bælgplante-rodknolde drives af energi fra værtplanten. Meget tyder på, at energien til N_2 -bindingen hovedsagelig stammer fra planteproducerede C_4 -dicarboxylsyrer, som optages i rodknoldens bakteroider. C_4 -dicarboxylsyre dannes i plantevævet bl.a. som et produkt fra mørkebinding af CO_2 ved aktivitet af enzymet fosfoenolpyruvatcarboxylase (PEPC). Arbejdet er nærmere beskrevet i oversigtsartiklen "Symbiotisk kvælstofbinding" side 30. (Lis Rosendahl).

3.1.8. Ærtemutanter

Afdelingens samling af ca. 50 ærtemutanter, som enten ikke danner rodknolde, eller som danner ikke-funktionsdygtige knolde, undersøges genetisk, fysiologisk og biokemisk. De biokemiske undersøgelser med SDS-polyacrylamid gel elektroforese for proteiner har vist, at samtlige mutanter med nedsat kvælstofbinding i knoldene har nedsat indhold af alle knoldproteiner eller nedsat indhold af store grupper af proteiner. Der er ikke fundet noget tilfælde, hvor der har manglet et enkelt protein eller er fremkommet et nyt. Ærtemutanterne synes derfor fortrinsvis at være "regulatoriske" mutanter i lighed med de fleste højlysin mutanter i byg.

Sammenkrydsningerne af de forskellige mutanter til test for komplementering og alleli har måttet gentages flere gange end antaget, da adskillige mutanters fænotype er ustabil. Det synes at have meget at gøre med lufttilgangen til rødderne. For eksempel får den dominante, ikke nodulerende mutant, Risnod 15, rodknolde, når den dyrkes i dyb vandkultur.

Dette er i overensstemmelse med erfaringerne fra andre mutantsamlinger. Det er påvist, at en ikke-knolddannende vikkemutant danner knolde, når ethylensyntesen hæmmes med inhibitorer. Det er derfor nærliggende at antage, at ethylenregulerin-

gen af knolddannelsen er forstyrret i nogle af vores mutanter. (Kjeld Engvild).

3.1.9. Planternes optagelse af cæsium

I samarbejde med Helsefysikafdelingen undersøges planternes optagelse af radioaktivt cæsium i karforsøg. Forsøg har vist store forskelle - op til 30% - mellem bygsorters optagelse af cæsium. Disse forsøg blev gentaget og udvidet i 1989 for nøjere at fastlægge disse forskelle. Desuden belystes optagelsen af cæsium fra svensk jord, der er forurenset med radioaktivt cæsium fra Tjernobyl, og i en standardjord samt betydningen af "aldringseffekten" på planternes cæsiumoptagelse. (Gunnar Gissel Nielsen).

3.1.10 Afsvovlingsprodukter

I karforsøg undersøges virkningen af kalkkammonsalpeter tilsat et kalkbaseret afsvovlingsprodukt, der svarer til 2, 4 og 6% S. Undersøgelserne viste ingen signifikant skadevirkning af afsvovlingsprodukter ved de tre anvendte mængder, når gødningen blev tilført inden eller samtidig med såning. Ved senere tilførsel var der et insignifikant fald på nogle få procent i udbyttet. Kvælstofvirkningen var den samme som for almindeligt kalkkammonsalpeter. (Gunnar Gissel Nielsen).

Publikationer

Bertelsen, Finn: Reduction of nitrate to nitrous oxide or dinitrogen by *Rhizobium leguminisartum*. - Proc. German Soil Science Society (under trykning).

Bertelsen, Finn, 1989: The Chemistry of Sulphite (2-) in Soil. - Nordisk Jordbrugsforskning 71(1): 52-53.

Christensen, B.T., F. Bertelsen and G. Gissel-Nielsen, 1989: Selenite fixation by soil particle size separates. - J. Soil Sci. 40: 641-647.

Eckholdt, A., Jensen, E.S. og Ravn, H.P., 1989: Bladrandbiller i ærter. Hvad betyder de for udbyttet? - Ugeskrift for Jordbrug 15: 220-223.

Egsgaard, Helge, Elfinn Larsen and Erik Steen Jensen, 1989: Evaluation of automated determination of nitrogen-15 by on-line combustion. Short Communication. - Analytica Chimica Acta 226: 345-349.

Engvild, K.C., 1989: The death hormone hypothesis. - Phys. Plant. 77: 282-285.

Engvild, Kjeld C., 1989: Number and Effectiveness of Pea Rhizobia in Danish Soils. - Acta Agric. Scand. 39: 3-7.

Gissel-Nielsen, Gunnar and Finn Bertelsen, 1989: Ammonia-based flue gas desulphurization waste solution as a nitrogen fertilizer. - Environ. Geochem. Health. 11: 54-56.

Jakobsen, I. and L. Rosendahl: Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. - New Phytologist 114 (under trykning).

Jensen, E.S., 1989: Use of ¹⁵N enriched plant material for labelling of soil nitrogen in legume dinitrogen fixation experiments. - Risø-M-2790, pp. 27.

Jensen, E.S.: Mineralization, leaching, and plant uptake of nitrogen from N-15 labelled catch crop residues decomposing in the field. - Nordisk Jordbrugsforskning (Abstract) (under trykning).

Jensen, E.S.: Mineralisering, udvaskning og planteudnyttelse af ¹⁵N-mærket kvælstof fra efterafgrødemateriale. - NJF rapport fra seminar no. 149. Decomposition and Soil Organic Matter, Tune 10.-13. September 1989 (under trykning)

Jensen, E.S., 1989: The role of pea cultivation in the nitrogen economy of soils and succeeding crops. - In Legumes in Farming Systems (Placquant, P. and R. Haggard, eds.), Kluwer Academic Press, Dordrecht. pp. 3-15.

Jensen, E.S., 1989 : Agerjorden - en brik i spillet om vort vandmiljø. - Risø Nyt nr. 1: 11-13.

Jensen, E.S. and Haahr, V. : The effect of pea cultivation on succeeding winter cereal and winter oilseed rape nitrogen nutrition. - Applied Agricultural Research (under trykning).

Jensen, E.S., Christensen, B. T., and Sørensen, H.S., 1989: Mineral fixed ammonium in clay and silt size fractions of soils incubated for five years. - Biology and Fertility of Soils 8: 298-302.

Jensen, E.S., Eckholdt, and Ravn, J.P. : Stribet bladrandbille og N-fiksering i ært. 6. Danske Planteværnskonference. Sygdomme og Skadedyr: 229-237.

Rosendahl, Lis, 1989: Central aspects of C metabolism in symbiotic N₂ fixation. - Licentiaafhandling pp. 78.

Rosendahl, Lis, Carroll P. Vance, Susan S. Miller and Evert Jacobsen, 1989: Nodule physiology of a supermodulating pea mutant. - Physiol. Plant. 77. 606-612.

Skou, J.P. and I. Jakobsen, 1989: Two new *Glomus* species from arable land. - Mycotaxon 36: 277-282.

Sommer, S.G., B.T. Christensen, J. Grønbech Hansen, W. Asman, Lone Grundahl, Jan K. Schjørring, Henrik Saxe, and E.S. Jensen, 1989: På sporet af atmosfærisk ammoniak. - Vand & Miljø 2: 56-62.

Ohlenschläger, Mette and Gunnar Gissel-Nielsen, 1989: Transfer of radiocaesium to barley, rye grass and pea. - Risø-M-2831, pp. 20.

Posters

Bertelsen, Finn: Reduction of nitrate to nitrous oxide or dinitrogen by *Rhizobium leguminosarum*. - International Workshop on Denitrification in soil, Rhizosphere and Aquifer, Giessen, Vesttyskland, 17.-19. marts og International Symposium on Denitrification in Soil and Sediment, Århus, d. 9. juni.

Egsgaard, H., E.S. Jensen and E. Larsen, 1989: Nitrogen Isotope Measurements. - 7. Nordiske Massespektrometer Konference, Geilo, Norge, 22.-25. januar.

Foredrag

Bertelsen, Finn: Denitrifikation og bælgplantedyrkning. - Danmarks Mikrobiologiske Selskab, 18. maj.

Gissel Nielsen, Gunnar: Planteproduktion og etik. - Århus Amts Landboforening, 1. februar.

Gissel Nielsen, Gunnar: Selen i jord og planter. - Seminar på Odense Universitet, 16. marts.

Gissel Nielsen, Gunnar: Tjernobyl og radioaktivt Cs i planterne. - "Mondorama", 3. august.

Gissel Nielsen, Gunnar: Foderstoffernes indhold af mikro-mineraler. - Dansk Biologisk Selskab, 22. september.

Gissel Nielsen, Gunnar: Bioteknologi og landbrug. - Vejle Amts Landboforening, 24. november.

Gissel Nielsen, Gunnar: Spormineraler i jord og planter. - Hads Herreds Landboforening, Odder, 6. december.

Jakobsen, I.: Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. - NJF-seminar: Decomposition and soil organic matter, Tune Landboskole, 10.-13. september.

Jensen, E.S.: Kvælstofbinding hos ært. Seminar ved Zoologisk Afd., Planteværnscenteret, 17 Februar.

Jensen, E.S.: Biological N₂ fixation research at Risø National Laboratory. - Guanajuato, Mexico, 23.-25. januar.

Jensen, E.S.: Kvælstofbinding hos ært. - Seminar ved Zoologisk Afdeling, Planteværnscenteret, 17. februar.

Jensen, E.S.: Bælgplanterne, N-fiksering og forfrugtsværdi. - Forelæsning ved kurset: Alternativt Jordbrug, KVI, 15. Marts.

Johansen, Anders: Muligheder for anvendelse af VA-mycorrhiza i grønsags-, frugt- og bær dyrkning. - Koldkærgård Landboskole, 8. november.

Skou, J.P.: VAM-svampe (*Endomycorrhiza*) - specielt to nye arter fra dansk agerjord. - Dansk Planteepatologisk Selskab, 12. december.

4. Andre faglige aktiviteter

Afdelingens medarbejdere har deltaget i koordineringen af forskellige forskningsområder under EF, OECD og IAEA og har været medlemmer af udvalg og arbejdsgrupper under Nordiske Jordbrugsforskeres Forening, Arbejdsplanudvalg ved Statens Planteavlsvforsøg, Landbrugsministeriets planteforædlingsudvalg, Statens Jordbrugs- og Veterinærvidenskabelige Forskningsråd og udvalg nedsat af dette råd, Miljøstyrelsens Luftforureningslaboratorium, Miljøvæmscentret ved KVL, Dansk Genbanknævnet og i Forureningsudvalget under Danmarks Naturfredningsforening, ligesom flere medarbejdere i årets løb har fungeret som censorer, medlemmer af bedømmelsesudvalg og som referenter for internationale tidsskrifter.

Plantemateriale fra afdelingens forsøg af interesse for planteforædlingsformål stilles til rådighed for danske planteforædlere via "Planteforædlings-nyt". Desuden er der efter anmodning fra danske og udenlandske institutioner og planteforædlere sendt materiale af forskellige byg- og ærtemutanter. Yderligere er der udført fysisk og kemisk mutagen behandling af plantemateriale for planteforædlingsvirksomheder.

Fra afdelingens samling af meldugisolater og resistente sorter har vi leveret materialer til resistensundersøgelser hos danske og udenlandske forædlere og forskningsinstitutioner.

Der er udført ^{15}N analyser på afdelingens massespektrometer for Statens Planteavlsvforsøg, Danmarks Miljøundersøgelser og Rigshospitalet.

Til brug i biologiuundervisningen i HF, gymnasier og seminarier er der udsendt plantemateriale. Materialet viser artsforskelle i strålingsfølsomhed, forskellige mutanttyper i byg med klorofyldefekter og en- og to-gen Mendel-spaltninger. Fra 1. august sælges dette undervisningsmateriale til alle interesserede. I årets løb er der udsendt i alt 1185 sæt plantemateriale fordelt på 260 forsendelser.

Dyskærgård

Driften af Dyskærgård er i 1989 forløbet planmæssigt. De klimatiske betingelser for planteavl har været særdeles gunstige, og der har ikke været væsentlige angreb af sygdomme. Høstudbytteerne har, bortset fra udbyttet af ært, været tilfredsstillende. Kvægholdet har givet et rimeligt økonomisk resultat. (Vagner Haahr).

5. Øvrige aktiviteter

5.1. Seminare:

19. januar - Jens Jensen: "Beregning af rekombinationsfrekvens til QTL." (quantitative trait locus).

2. februar - Flemming Ahrenkiel og Bent Flensø, Danisco Bioteknologi A/S: "Produktion i plantecellekulturer".

16. februar - Peter Strugaard, Biokemisk Laboratorium, De Danske Sukkerfabrikker: "Herbicidresistens i sukkerroer: Isolering og karakterisering af AHAS-genet".

2. marts - Lynette Abbott, University of Western Australia, Australien: "The potential for management of VA mycorrhizal fungi".

16. marts - Rikke Bagger Jørgensen: "Mikrosporekultur og transformation af byg".

30. marts - M.N. Sudin, The Rubber Research Institute of Malaysia: "Recent nitrogen studies in rubber and associated legumes".

12. april - Adam Wilkins, Cambridge University Press, U.K.: "Pattern formation in *Drosophila*. Some recent ideas" (Abstract).

13. april - J. Helms Jørgensen: "Mutation i byg/meldug systemet - erfaringer og planer".

27. april - Binger Lindberg Møller, Inst. for Plantefysiologi, Den Kgl. Vet.- og Landbohøjskole: "Biosyntese af cyanogene glycosider".

11. maj - J.P. Skov: "Er der stadig en realistisk mulighed ved bekæmpelse af frodbare sygdomme i byg?"

25. maj - Ulla Rasmussen: "Lokalisering af chymotrypsin-inhibitor i byg ved hjælp af guldmærkede antistoffer".

8. juni - Georg Skot, Novo Biokontrol: "Mikrobiel bekæmpelse af plantesygdomme".

15. juni - James Brown, AFRC Inst. Plant Science Research, Cambridge, U.K.: "Evolution and genetics of the barley mildew pathogens in relation to methods of disease control".

10. august - Lis Rosendahl: "Substratforsyning til N-fiksierende bakterier".

24. august - Iain Donaldson, University of Oxford, U.K.: "The metabolism of sucrose by barley powdery mildew".

7. september - Ole Schou: "Immunologisk påvisning og foreløbig karakterisering af et embryonspecifikt protein".

21. september - Morten Jønborg, Biokemisk Laboratorium, DANISCO A/S: "Transformation af protoplaster ved elektroporation og mild selektion".

5. oktober - Per Strøm, Genetisk Afdeling, Chr. Hansen Laboratorium A/S: "Heterolog genekspression i *Mucor* (mag)".

19. oktober - Kjeld Engvild: "Dødehoften hypotesen".

2. november - Jan Schjørring, Institut for Planterøgsting, KVL: "Ammeningsfordampning fra planter".

16. november - Kirsten Engel, Botanisk Laboratorium, KU: "Strukturel undersøgelse af zygotisk udviklede bygfrøer".

30. november - Ib Linde-Larsen: "Gissem C-blodtærmning af byg (*Hordeum*) arter og interspecifikke hybrider".

14. december - Kirsten A. Nielsen: "Etablering og biokemisk karakterisering af byg suspensionskulturer. Påvisning af extracellulære proteiner".

5.2. Rejser og studieophold i udlandet

5.2.1. Rejser

Lars Andersen, J. Helms Jørgensen og Kirsten Kragh deltog i oktober i Nordisk symposium Application of Recombinant DNA Research for Plant Disease Control, Lamm, Finland.

Lars Andersen, V. Haahr og Jens Jensen deltog i februar/marts i XII Eucarpia Congress, Göttingen, Vesttyskland. I forbindelse med kongressen aflagde Lars Andersen studiebesøg på forskellige institutioner i Holland og Vesttyskland.

Margit Andersen og Inge Merete Larsen var i maj på en uges studieophold på Kiel Universitet for at lære sekventering.

Dvora Berenstein og Henriette Giese var i september i Cambridge, England, for at drøfte samarbejde angående RFLP i byg i forbindelse med et EF-projekt.

Finn Bertelsen deltog i marts i Workshop on Denitrification in Soil, Rhizosphere and Aquifer, i Giessen, Vesttyskland.

Hans Doll, Rikke Bagger Jørgensen og Søren Rasmussen deltog i marts i Seminar om plantecelle-vævsteknik. Seminaret var arrangeret af Nordisk Ministerråd og blev afholdt i Helsingfors, Finland.

Kjeld Engvild deltog i oktober i Int. Congress Environmental Research with Plants in Closed Chambers i München, Vesttyskland og har desuden deltaget i møde i redaktionskomiteen for *Physiologia Plantarum*. Henriette Giese har i juni aflagt besøg på Münster Universitet, Vesttyskland, for at drøfte samarbejde angående RFLP i byg i forbindelse med et EF-projekt.

Gunnar Gisel Nielsen deltog i august i et internationalt møde om planteernæring i Wageningen, Holland samt i et NIF-seminar om calcium i jord og planter. Seminaret blev afholdt i Beitostølen, Norge.

Vagner Haahr deltog i tiden 19-24.11 i 40. Tagung der Vereinigung Österr. Pflanzenzüchter i Gumpenstein, Østrig.

Iver Jakobsen deltog i april i projektledermøde i Bruxelles, Belgien.

Erik Steen Jensen deltog i januar i et EF-koordineringsmøde i Mexico City.

Erik Steen Jensen har som medlem af bedømmelsesudvalg ved licentiateksamen på Norges Landbohøjskole foretaget rejser til Ås, Norge, og foretog i juni en rejse til Bremen, Vesttyskland vedrørende nyt måleudstyr hos firmaet Finnigan.

J. Helms Jørgensen deltog i april i møde vedrørende Europa's Cooperative Programme/Genetic Resources, Göttersleben, Østtyskland; i januar og maj i møder på Nordisk Genbank, Åkarp; og i juni i Symposiet "Nordisk Genbank i Samfundets Tjeneste", Lund, Sverige.

Rikke Bagger Jørgensen og Else Toftdahl Larsen aflagde i september studiebesøg på flere institutioner i England med henblik på et eventuelt projektsamarbejde.

Inge Knudsen har i januar deltaget i symposium om "New Direction in Biological Control" Frisco Colorado, USA.

Bo Lind-Larsen var i maj på studiebesøg ved Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der AFW der DDR, Gatersleben, og ved Institut für Züchtungsforschung Quedlinburg der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Quedlinburg.

Kirsten Nielsen og Søren Rasmussen var af Nordisk Råd inviteret til møde om "Methylering studier og forurening hos bygg" i september. Mødet blev afholdt i Finn, Norge.

Ulla Rasmussen aflegte i august besøg på Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Canada og deltog i oktober i Workshop on Pathogenesis-related proteins in plants i Valencia, Spanien.

Lone Rasmussen deltog i maj i NATO-workshop "Molecular signals in microbe-plant symbiotic and pathogenic systems" i Biddingehuizen, Holland.

J.P. Sørensen deltog i august i "Workshop on arbuscular mycorrhizal fungi" på West Virginia University, Morgantown, USA.

Bodil Thielcke deltog i september i EMBO Symposium, der blev afholdt i Heidelberg, Vesttyskland.

5.2.2. Studierophold

Iver Jakobsen og Lis Rasmussen påbegyndte den 25. september et 1-års studierophold ved Murdoch School of Agriculture, University of Western Australia, Nedlands, og School of Biological and Environmental Sciences, Murdoch University, Murdoch, Western Australia.

6. Personale, gæsteforskere og studerende

Afdelingens personale omfattede pr. 31. december 1988 i alt 60 personer inkl. deltidsansatte; personalnormeringen var ved årets udgang på i alt 36 årsværk (15 A- og 21 B-stillinger); 3 licentiatstuderende var aflønnet over Risø's stipendiekonto. Der var ansat 8 A- og 6 B-medarbejdere samt 4 licentiatstuderende på eksternt finansierede projekter og 1 licentiatstuderende med kandidatstipendium fra KVL. I årets løb har 7 laborantelever haft praktikperioder på afdelingen, og studerende fra KVL og universiteterne har udført hoved- og specialopgaver eller dele deraf på afdelingen.

6.1. Personale og stipendiater

Andersen, Arna J., afdelingsleder, dr.agro.
Andersen, Bente, laborant
Andersen, Lars, cand.agro.
Andersen, Lis Brandt, forsøgsmedhjælper
Andersen, Margit Elm, laboratorietekniker
Berenstein, Dvora, cand.scient.
Bertelsen, Finn, stud.lic.scient.
Brink Jensen, Merete, laboratorietekniker
Christiansen, Solveig Krogh, stud.lic.agro.
Djurdjevic, Stanko, teknisk medarbejder
Doll, Hans, centerleder, lic.agro.
Dyrsgaard Jensen, Lone, laboratorietekniker

Engvild, Kjeld, mag.scient.
Frederiksen, Peter, medhjælper (1/4-31/10)
Gade, Poul, gartner
Giese, Henriette, lic.agro.
Gissel Nielsen, Gunnar, dr.agro.
Hansen, Ina, laboratorietekniker
Hasselbalch, Finn, forvalter
Henriksen, Ebbe, forsøgsformand
Holm-Jensen, Anne Grethe, lab.tekniker
Haahr, Vagner, driftsleder, lic.agro.
Ibsen, Elly, laborant
Jakobsen, Iver, lic.scient.
Jensen, Anne Mette, lab.elev (1/8-31/12)
Jensen, C. John, B.Sc. (til 1/6)
Jensen, Erik Steen, lic.agro.
Jensen, Hans Peter, cand.agro.
Jensen, Jens, lic.agro.
Johansen, Anders, stud.lic.scient. (fra 1/3)
Johansen, Hanne Bay, laboratorietekniker
Jørgensen, Jørgen Helms, lic.agro.
Jørgensen, Malene Leth, lab.elev (til 31/8)
Jørgensen, Rikke Bagger, lic.scient.
Karlsen, Aage, forsøgsassistent
Knudsen, Inge, cand.scient.
Kragh, Karsten M., stud.lic.agro.
Køie, Bertel, lic.techn.
Larsen, Else Toftdahl, cand.agro. (fra 1/3)
Larsen, Hanne Egerup, laborant
Larsen, Inge Merete, laboratorietekniker
Larsen, Lotte, lab.elev (1/2-30/6)
Larsen, Tenna, lab.elev (1/8-31/12)

Lemée, Beth, laborant
Lilholt, Ulla, laboratorietekniker
Linde-Laursen, Ib, dr.agro.
Mathiasen, Winnie, kontorass. (til 31/12)
Meltøfte, Liselotte, lab.Overassistent
Nielsen, Kirsten, stud.lic.scient.
Nielsen, Vagn Aage, gartner
Olsen, Anette, laboratorietekniker
Ottosen, Helle, lab.elev (til 15/6)
Pedersen, Lars H., stud.lic.scient.
Petersen, Lene, cand.agro. (11/9-22/12)
Petersen, Lis, overassistent
Poulsen, Aksel, forsøgsassistent
Poulsen, Karin, lab.elev (fra 1/9)
Rasmussen, Merete, stud.lic.agro. (fra 1/6)
Rasmussen, Søren, civilingeniør
Rasmussen, Ulla, stud.lic.scient.
Risager, Kirsten, lab.elev (fra 1/5)
Rosendahl, Lis, lic.scient.
Rossen, Lone, cand.agro., Ph.D.
Schou, Ole, lic.scient. (til 30/9)
Sillesen, Anette, laborant
Skou, Jens Peder, dr.agro.
Skovsgaard, Bent, forsøgsassistent
Sørensen, Anni, assistent
Theilade, Bodil, stud.lic.scient. (fra 1/2)
Thomsen, Jørgen D., ingeniør
Vestesen, Hans, forsøgsassistent

6.2. Udenlandske gæsteforskere

Lynette Abbott, Soil Science and Plant Nutrition, School of Agriculture, University of Western Australia (projekt 3.1.5.)

Luciana Corazza, Istituto Sperimentale per la Patologia Végétale, Roma, Italien (projekt 2.3.)

Iain Donaldson, Department of Biochemistry, University of Oxford, England (projekt 2.3.)

Marina B. Gramatikova, Institute of Barley Breeding, Section Karmobat, Bulgarien (projekt 2.3.4.)

H.L. Heszky, Department of Plant Breeding, University of Agriculture, Gödöllő, Ungarn (projekt 2.2.1.)

Dr. Mohd Noor Sudin, The Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia (projekt 3.)

6.3. Studerende

Charlotte Bang, Ann Dorte Burmeister, Stefan Frello, Christine Green og Lars de Neergaard fra Roskilde Universitetscenter gennemførte et 2 måneders studieprojekt om bygstribesyg og afsvampning (projekt 2.3.7.)

Lisbeth Borbye, Havebrugsinstituttet, KVL, hovedopgave (projekt 2.1.3.)

Anette Eckholdt, Zoologisk Institut, Den Kgl. Vet. og Landbohøjskole (hovedopgave, projekt 3.1.3.)

Anette Johansson, KU, hovedopgave (projekt 2.1.11)

7. Udvalgte emner

7.1. Kitinase i byg og raps

Karsten M. Kragh og Ulla Rasmussen

Kitinase er fællesnævneren for en række resistensbiologiske samarbejdsprojekter under Det Bioteknologiske Center for

Planter. Landbrugsafdelingen på Risø bidrager med to licentiatprojekter, som omhandler kitinase i henholdsvis byg og raps.

Planter er udsat for angreb af adskillige svampe, bakterier og virus. Som regel er

planterne resistente, så kun få af de mange angreb resulterer i plantesygdomme. Alligevel og på trods af intensiv pesticid anvendelse reduceres verdens planteproduktion meget betydeligt på grund af plantesygdomme. Nye bioteknologiske metoder har gjort det muligt at studere og modificere planter's resistensmekanismer på det molekylære plan. Gensplejsning og genoverførsel forsøges nu i stigende grad anvendt til at frembringe planter med forbedrede resistensegenskaber.

Resistensmekanismer

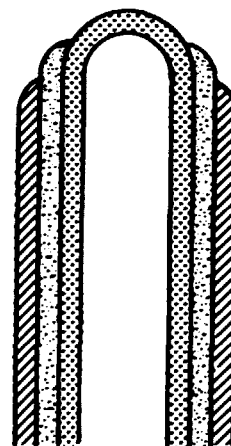
I bestræbelserne på at finde metoder til at øge planter's resistens over for svampe har man bl.a. fokuseret på planter's egne resistensmekanismer. De omfatter mekaniske barrierer for sygdomsvoldere såsom papildannelse, lignificering, syntese af svampehæmmende stoffer som fytoalexiner, og hydrolytiske enzymer m.m. De hydrolytiske enzymer kitinase og 1,3- β -glucanase har fået særlig stor opmærksomhed, fordi de som enkeltgen-produkter relativt nemt kan håndteres med de genteknologiske teknikker.

Substratet for kitinase, kitin, er en β -1,4 bundet polymer af N-acetylglucosamin. Kitin er efter cellulose den hyppigst forekommende polymer i naturen. Den findes i visse alger, men er ikke fundet i højere planter. I svamperiget er kitin meget udbredt, idet den er en væsentlig cellevægskomponent i hyferne hos alle ascomyceter, basidiomyceter og deuteromyceter. Da kitin ikke findes i højere planter, kan kitinaser ikke tillægges nogen funktion i planter's egen metabolisme. Derimod tyder meget på, at de fungerer som en forsvarsmekanisme imod kitinholdige svampe.

Forekomst og virkemåde

Ved svampeangreb stiger kitinase-aktiviteten i planter. I rapsblade inficeret med *Phoma lingam* eller *Cylindrosporium concentricum* (som forårsager sygdommene rodhalsråd og lys bladplet) har vi fundet en

stigning på op til 15 gange niveauet i ikke-inficerede planter, hvorimod aktiviteten i melduginficerede bygblade kun steg med op til 4 gange. I både agurk og tobak har man efter svampeinfektion fundet en systemisk induktion af kitinase, i ikke-inficerede blade. Denne induktion har vist sig at være sammenfaldende med en øget resistens imod efterfølgende svampeangreb. I raps har vi ikke fundet systemisk induktion ved svampeangreb.



- kitin
- ⊗ β -1.3 glucan
- ▨ andre komponenter

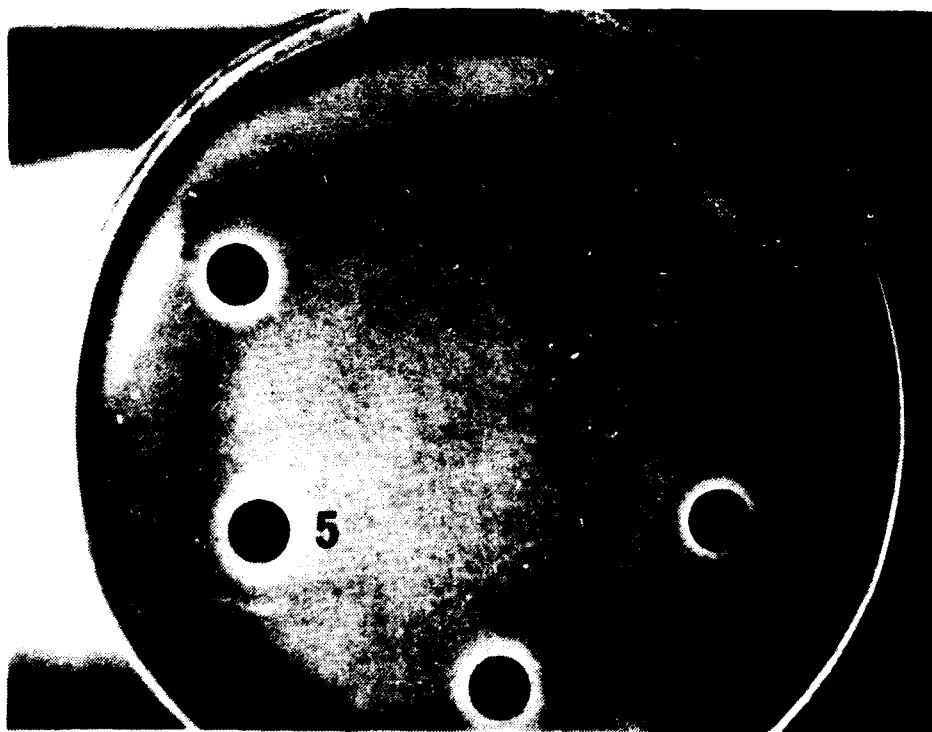
Figur 1. Generaliseret model af en voksende svampehyfes cellevæg.

Kitinaser er blevet oprenset fra adskillige plantearter. Oprensningen kan ske ved hjælp af søjler af kitin, som specifikt tilbageholder kitinaser og andre proteiner, som binder sig til kitin. Til yderligere oprensning af enzymerne anvendes højtrykssvækkromatografi (HPLC). Vi har oprenset kitinaser fra meldug-inficerede bygblade og fra rapsblade inficeret med *Cylindrosporium concentricum*. Fra bygblade er der oprenset seks proteiner med forskellig grad af kitinase-aktivitet. En foreløbig oprensning fra rapsblade viser, at der findes mindst syv proteiner med høj kitinase-aktivitet. Desuden er der i samarbejde med

stud.lic.scient. Kirsten Nielsen blevet oprenset en kitinase, som ophobes i bygcellesuspensionskulturer.

Kitinaser fra planter er endokitinaser, som hydrolyserer inde i kitinkæden. I modsætning hertil står bakterielle exokitinaser, som hydrolyserer N-acetylglucosaminenheder fra enden af kitinkæden. Blandt de 6 proteiner, som er oprenset fra bygblade, er der en basisk endokitinase på 30 kD med høj kitinase-aktivitet. En partiel aminosyresekvens af dette enzym viser stor lighed med to kitinaser fra bygkerner og kitinaser fra andre planter. Kitinasen fra bygsuspensionskulturene svarer ikke til nogen af dem, der kendes fra bygblade eller -kerner.

Kitinaser har antifungal aktivitet. De kan hæmme hyfevæksten af svampe, som gror på kunstigt næringsmedie, ved at nedbryde kitin i deres hyfespidser, hvor den udgør det yderste cellevægslag (se fig. 1). Derved ødelægges den balance mellem opbygning og nedbrydning af kitin, som er nødvendig, for at hyferne kan vokse. Kitinasen på 30 kD fra bygblade kan hæmme væksten af *Trichoderma viride* (se fig. 2). Desuden tyder foreløbige resultater på, at tre andre kitinbindende proteiner fra bygblade også har antifungal aktivitet, til trods for at deres kitinase-aktivitet er meget lav (se fig. 2).



Figur 2. Bioassay for svampehæmmende aktivitet af en kitinase og 3 kitinbindende proteiner fra bygblade. 24 timer efter spredning af *Trichoderma viride* sporer på en agarplade blev buffer (B, BS), 2 g 30 kD kitinase og 2 g af de kitinbindende proteiner nr. 3, 5 & 6 (3, 5, 6) afsat på filtrerpapirskiver på agarpladen. Den blev fotograferet 25 timer senere. Den svampehæmmende effekt ses som lyse zoner med nedsat hyfevækst omkring filtrerpapirskiverne.

For at forstå kitinasernes funktion er det vigtigt at vide, hvor i planten de findes i forhold til de angribende svampe. Man har fundet, at kitinaser i mange svampeinficerede planter ophobes i bladenes intercellulærrum. Det er endnu uvist, om disse kitinaser udskilles aktivt til intercellulærrummene, eller om de frigøres fra vakuolen ved celledød. Det er heller ikke påvist, at kitinaserne hæmmer angribende svampes hyfevækst i planterne. Vi ønsker at undersøge dette og lokaliseringen af kitinaser i svampeinficerede rapsblade ved hjælp af immunohistologiske metoder.

7.2. Symbiotisk kvælstofbinding

Lis Rosendahl

Kvælstof (N) er det begrænsende næringsstof for de fleste planters vækst. Betydningen af N-optagelse og assimilation for planternes vækst og udvikling overgås kun af fotosyntese. Planter forsynes med N fra to kilder: 1) fra jord via gødskning og/eller mineralisering af organisk stof, og 2) fra atmosfæren via symbiotisk N_2 -binding i mikroorganismer.

Maksimalt proteinudbytte fra landbrugsdrift forudsætter store mængder plantetilgængeligt N og er forbundet med et stort energiforbrug. Størstedelen (ca. 37%) af landbrugets energiforbrug går til kunstgødning og pesticider, mens brændstof til maskiner tegner sig for ca. 20% af energiforbruget. Omkring 2% af verdens samlede energiforbrug går til fremstilling og udbringning af kunstgødning.

Bælgplanteafgrøder fordrer ikke anvendelse af N-gødskning. Det skyldes, at denne plantegruppe, som den eneste blandt landbrugsafgrøder, etablerer et snævert samliv (symbiose) med bakterier af rhizobieslægten, der er i stand til at udføre biologisk N_2 -binding. Symbiosen fører til dannelse af rodknolde, hvori bakterierne omdannes til bakteroider, som er i stand til at binde atmosfærisk N_2 til plantetilgæng-

Yderligere er det vigtigt at vide, hvordan induktionen af kitinaser reguleres. Det vides, at den i en række planter skyldes aktivering af kitinase-gener. Nu foretages der i laboratorier verden over studier af promoterregionen af kitinase-gener for at afklare, hvordan genekspressionen styres. Her på afdelingen er vi i færd med at klonе kitinase-gener fra raps. De vil blive anvendt til *in situ*-hybridisering, hvorved man kan lokalisere de planteceller, som viser aktivering af kitinase-gener ved svampeangreb.

geligt ammoniak gennem aktivitet af enzymet nitrogenase. Ammoniakken eksporteres til rodknoldens plantedel og udnyttes af planten som N-kilde.

Tidligere forsøg udført på Risø har godtgjort, at ca. 75% af det N, man finder i en ærteafgrøde ved høst, stammer fra symbiotisk N_2 -binding. Planteresterne efter en bælgplanteafgrøde er meget rige på N. Dersom udvaskning af dette N forebygges ved at opretholde plantedække på marken, vil efterfølgende afgrøder kunne udnytte denne N-pulje.

Omdannelsen af atmosfærisk N_2 til ammoniak er en meget energikrævende proces. I den symbiotiske N_2 -binding er det planten, der forsyner bakterierne med det nødvendige brændstof. Dette produceres ved fotosyntese med sollys som energikilde, og det anslås, at op mod ca. 30% af plantens fotosyntese-produkter i form af sucrose transporteres til og forbruges i rodknoldene (Figur 1). Planten er i stand til at kompensere for dette kulstof (C)-dræn ved at øge fotosynteseraten; men meget tyder på, at C alligevel er en begrænsende faktor for den symbiotiske N_2 -binding. Det forventes således, at en mere målrettet udnyttelse af C til N_2 -binding i rodknoldene vil have en positiv effekt på N-udbyttet i værtplanten.

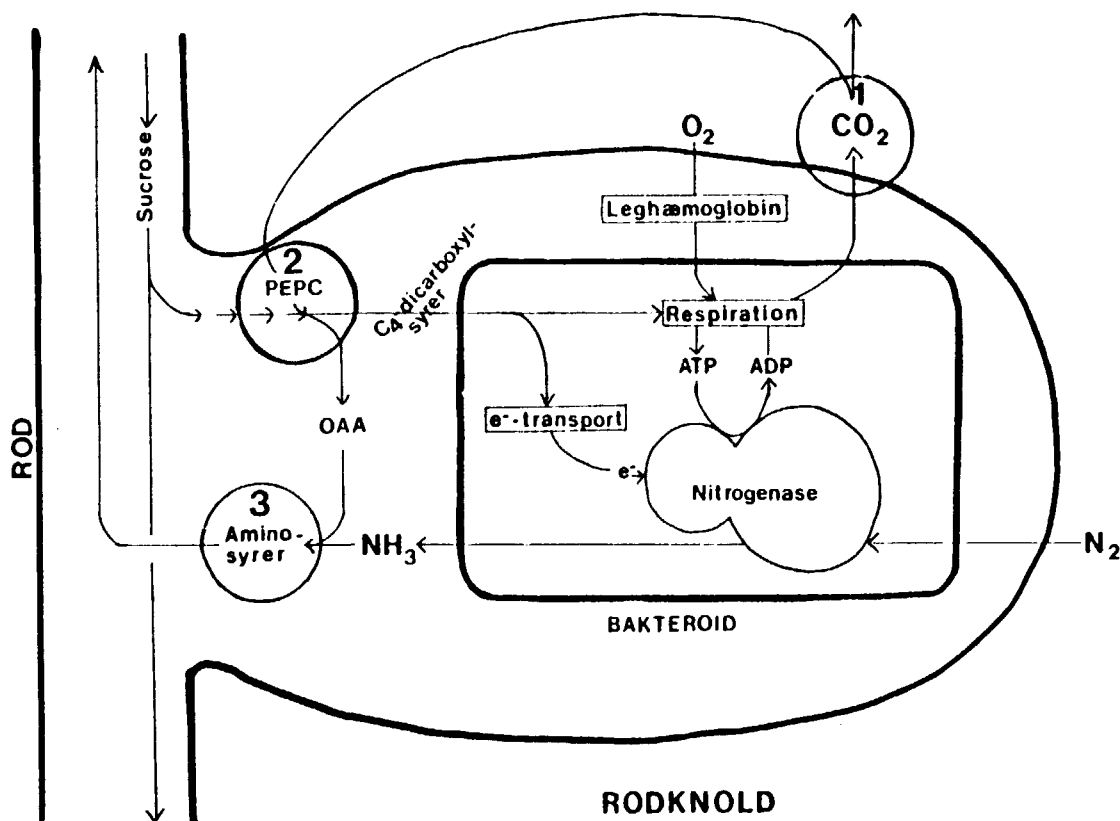
Vi har udført biokemisk-plantefysiologiske studier af nogle af de processer i ærterodknoldenes C-metabolisme, der er centrale for rodknoldens C-økonomi. Processerne, der er angivet med cirkler, se 1, 2 og 3 i figur 1, er blevet sammenlignet i symbioser, der resulterer i forskellige N-udbytter forårsaget enten af bakterie- eller værtplante-genotypen.

C-forbrug til nitrogenaseaktivitet og til generel metabolisme

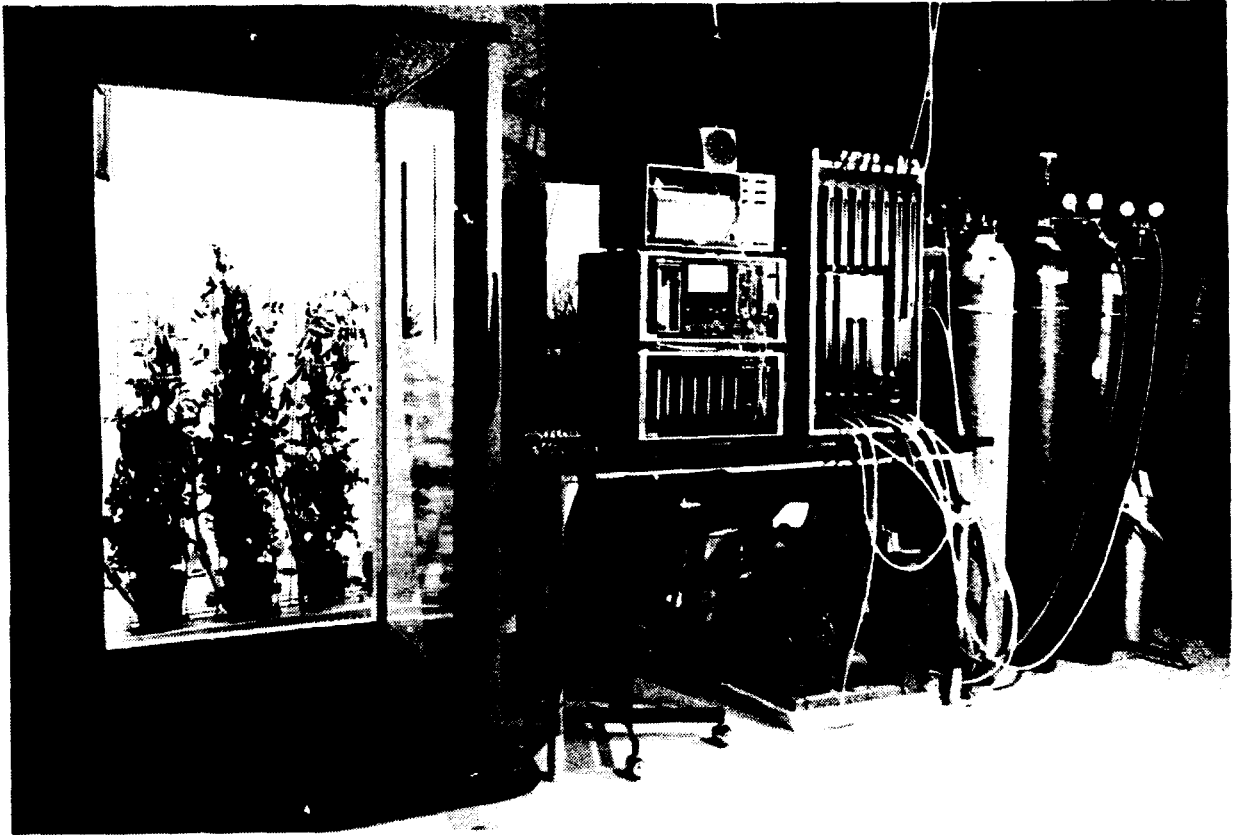
Den respiratoriske CO_2 -udskillelse fra rodknoldene (Figur 1, cirkel 1) kan opdeles i den del, der hidrører direkte fra N_2 -bin-

dingsaktiviteten, og den del, der stammer fra vækst og vedligeholdelse af vævet.

Denne opdeling kan udføres ved samtidig måling af vævets respiratoriske CO_2 -udskillelse og aktiviteten af enzymet nitrogenase, der binder N_2 , i et åbent gas-flow system (Figur 2). Vores resultater viser, at C-omkostningerne, der er forbundet direkte med nitrogenase-aktiviteten, ikke er en begrænsende faktor for akkumulering af symbiotisk bundet N_2 . Den del af respirationen, der stammer fra vækst og vedligeholdelse af rodsystemet, kunne direkte relateres til rodsystemets størrelse, men var heller ikke relateret til N-akkumuleringen.



Figur. 1. Overordnede processer af C- og N-omsætningen relateret til den symbiotiske N_2 -binding i ærterodknolde.



Figur 2. Udstyr til samtidig måling af nitrogenaseaktivitet og rodsystemets respiration i åbent gas-flow system.

CO₂-binding i rodknolde

Der er en anseelig CO₂-bindingsaktivitet i plantedelen af rodknolde (Figur 1, cirkel 2). Rodknoldenes CO₂-binding er en mørkeproces, og energien til at drive processen er indeholdt i de produkter, der opstår under omsætningen af sucrose. CO₂-bindingen katalyseres af enzymet fosfoenolpyruvat-carboxylase (PEPC), som har en ca. 10 gange højere aktivitet i rodknoldvæv end i det øvrige plantevæv. Produktet af PEPC-aktivitet er C₄-dicarboxylsyre, som spiller en vigtig rolle i rodknoldene. C₄-dicarboxylsyre bruges som C-skeletter til assimilation af den ammoniak, der dannes ved den symbiotiske N₂-binding. Desuden tyder mange resultater på, at bakte-

roiderne hovedsagelig bruger C₄-dicarboxylsyre som substrat for N₂-bindingsprocessen. Vores resultater viser et sammenfald mellem en høj PEPC-aktivitet i rodknoldene og en stor N₂-binding. Vi har desuden leveret det første direkte bevis på, at produkterne af PEPC-aktiviteten i rodknoldens plantedel faktisk bliver optaget i bakteroiderne. Dette blev demonstreret i et eksperiment, hvor ærterodknolde blev inkuberet kortvarigt i en [¹⁴C]CO₂-atmosfære (Figur 3) efterfulgt af en kvantitativ og kvalitativ detektion af det bundne ¹⁴C i rodknoldenes bakteroider og plantevæv. Gennem dette eksperiment har vi opnået et betydeligt bedre kendskab til udvekslingen af metabolitter mellem værtplanten og mikrosymbionten, og resultaterne under



Figur 3. Inkubation af ærterodknoide i [^{14}C] CO_2 -atmosfære.

streger den centrale betydning af PEPC for den symbiotiske N_2 -binding. Resultaterne understøtter en hypotese om, at der mellem vært og mikrosymbiont sker en udveksling af metabolitter i et lukket system.

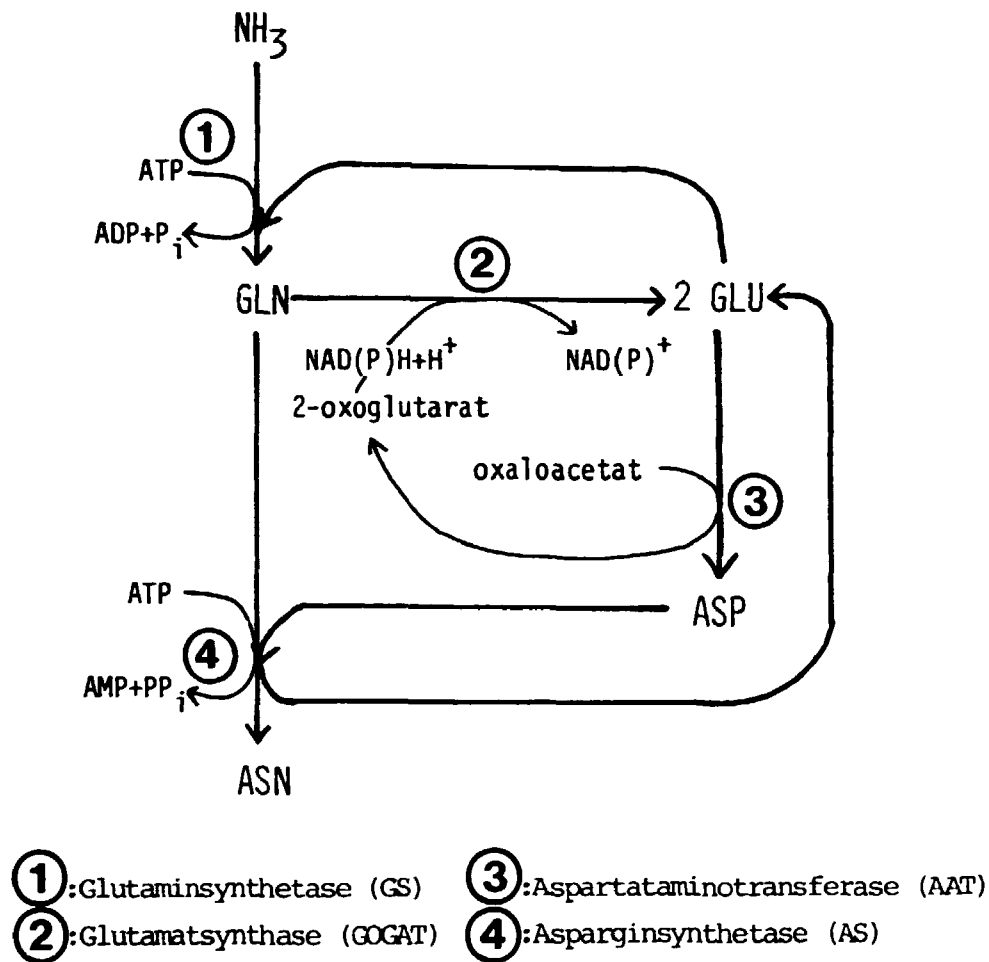
Dette forhold bliver belyst nærmere i igangværende forskning, hvor vi vil søge at belyse, hvordan de substrater, der direkte understøtter N_2 -bindingen, overføres fra bælgeplanten til bakteroiderne.

Andre laboratorier har identificeret PEPC fra lucerne-, bønne- og soyabønnerodknoide i henholdsvis to, tre og fem isoformer, og resultaterne tyder på, at en isoform af enzymet er specifik for rod-knoldvævet. Der foreligger ingen tidligere publicerede resultater, som beskriver oprensning og/eller karakterisering af PEPC fra ærterodknoide. Vi har udført en delvis oprensning af PEPC fra ærterodknoide. Vi har påvist, at der findes mindst to isoformer af enzymet i ærterodknoide, og at enzymet er opbygget af identiske polypeptid-enheder af en størrelse på ca. 100 kilo Dalton.

Assimilation af symbiotisk bundet N

Den ammoniak, der eksporteres fra bakteroiderne, bliver i plantedelen af rodknolden indbygget i aminosyrer, der via transport i xylemet fungerer som N-kilde for resten af planten (Figur 1, cirkel 3).

Assimilationen af ammoniak forløber i bælgeplanterodknoide med stor hastighed via den såkaldte GS/GOGAT-cyklus (Figur 4). Den skitserede assimilationsvej menes at være generelt gældende for N-assimilation i planter. Asparagin (Asn) er en af de vigtigste aminosyrer til transport af symbiotisk bundet N_2 . Oxaloacetat (OAA), som er det primære produkt af PEPC aktivitet, fungerer som C-skelet ved syntesen af Asn. Vi har konstateret et sammenfald mellem en høj aktivitet af PEPC i ærterodknoide og andelen af Asn relativt til andre aminosyrer i værtplantens xylem saft. Dette forhold understreger betydningen af PEPC i produktionen af C-skeletter til eksport af den symbiotisk bundne N_2 .



Figur 4. Assimilationsvej for symbiotisk bundet N_2 i ærterodknoide.

Konklusion

Vores biokemisk-plantefysiologiske studier af C-metabolismen i den symbiotiske N_2 -binding har vist, at symbiosens N-akkumulering hverken kan relateres til de C-omkostninger, som er direkte forbundet med nitrogenase-aktiviteten eller til netto CO_2 -afgivelsen fra rodsystemets respiratoriske aktivitet. Resultaterne tyder derimod

på, at den kvalitative sammensætning af de C-kilder, der stilles til rådighed for bakteroiderne, har væsentlig betydning for N_2 -bindingens størrelse.

Med en øget indsigt i de fysiologiske og molekylære mekanismer, som er involveret i samspillet mellem værtplante og bakterier, vil der være basis for frugtbare manipulationer af symbiosen til fordel for landbrugets produktion.

7.3. Biologisk bekæmpelse af meldug

Inge M.B. Knudsen

Biologisk bekæmpelse er ikke et nyt fænomen. Det kendes fra mange naturlige biotoper som det princip, der holder organismerne i balance over for hinanden i konkurrencen for at overleve. Princippet kan udnyttes i landbruget og gartneriet, hvor den naturlige balance mellem organismerne mangler, fordi der dyrkes en tæt bestand af monokulturer, hvilket favoriserer sygdomme og skadedyr.

Biologisk bekæmpelse har til formål at reducere bestanden af skadelige organismer. Det kan opnås ved at tilføre antagonistiske organismer, der enten lever af skadevolderen (hyperparasitter, predatorer), dræber den ved antibiose eller udkonkurrerer den. Desuden må den fysiologiske hæmning af patogener, der forekommer ved induceret resistens og i resistente planter i det hele taget, betragtes som biologisk bekæmpelse i videre forstand.

Det store kemikalieforbrug til bekæmpelse af plantesygdomme og den øgede opmærksomhed på de uheldige bivirkninger for miljøet har ført til, at der gøres mange bestræbelser for at nedbringe forbruget. Her kommer den egentlige biologiske bekæmpelse ind som en mulighed. Det skyldes især de gode resultater, der er opnået med bekæmpelse af skadelige insekter i væksthuse ved hjælp af rovmidler, snyltehvepse og lignende og med bekæmpelse af rodpatogener ved hjælp af antagonistiske svampe og bakterier. Hertil er der udviklet flere kommercielle produkter, som enten er baseret på udspredning af organismer eller på produkter udskilt af organismer. Når det gælder biologisk bekæmpelse af bladpatogener, er der imidlertid adskillige vanskeligheder i praksis - specielt på grund af organismernes krav til mikroklima, men der er dog opnået flere gode forskningsresultater på området.

Blandt bladpatogenerne har meldugsvampen størst økonomisk betydning. Biologisk bekæmpelse af agurkemeldug har

især stor potentiel interesse, da denne meldug har udviklet resistens over for mange kendte sprøjtemidler, og da overholdelse af sprøjtefrister (tidsrum fra sprøjtning til høst) er vanskelig på grund af hyppig og kontinuert høst af agurker. I øvrigt er der i dag udbredt brug af predatorer til biologisk bekæmpelse af skadedyr på agurker, hvilket kan bidrage til at motivere avlerne til en samlet strategi for at opnå pesticidfrie produkter.

Der kendes flere hyperparasitter på meldug, fx *Amphelomyces quisqualis* og *Tilletiopsis* spp. Specielt er biologisk bekæmpelse med *A. quisqualis* velundersøgt, men den kræver meget høj luftfugtighed til etablering og er vanskelig at opformere. En hollandsk undersøgelse har vist, at blandt mange hyperparasitter fik man størst bekæmpelse med *Tilletiopsis albescens*.

For en del år siden havde man på Risø problemer med opformering og vedligeholdelse af samlingen af isolater af meldug. Det viste sig, at samlingen var inficeret med arter af *Tilletiopsis*. Det gav ideen til at undersøge muligheden for biologisk bekæmpelse af meldug ved hjælp af *Tilletiopsis*. Nogle indledende forsøg med inokulering med *Tilletiopsis* på melduginficerede bygblade i skåle med vandagar viste så gode resultater, at et forskningsprojekt, finansieret af SJVF, blev indledt i 1987 med det formål at klarlægge muligheden for at anvende *Tilletiopsis* til biologisk bekæmpelse af meldug på byg og agurk.

Bekæmpelse af bygmeldug.

I 1988 og 1989 blev der udført markforsøg med biologisk bekæmpelse af bygmeldug. Til forsøgene blev anvendt det isolat af *T. albescens*, der i forforsøg havde givet den bedste bekæmpelse. Metoder til formering og udsprøjtning af *Tilletiopsis* var udviklet ved forsøg i marken 1987.

Der var god bekæmpelse i 1988, hvor der var ret jævn fordeling af nedbøren i vækstsæsonen. Samtidig var smittetrykket

af meldug ret lavt. Der konstateredes 87% bekæmpelse i begyndelsen af juli som følge af tilførsel af *T. albescens*, som da dækkede ca. 60% af bladarealet i parcellerne. Antallet af meldugkolonier på bygbladene var stærkt formindsket, og antallet af meldugkonidier, der blev produceret i parcellerne, blev reduceret. Væksten af *T. albescens* var størst i to perioder, der begge fulgte efter nogle dage med nedbør.

I 1989, der var præget af lange tørkeperioder, viste det sig, at vanding tidligt på sæsonen, før inokulering med *Tilletiopsis*, sikrede en tæt plantebestand. Dette må anses for årsagen til, at *Tilletiopsis*-svampen kunne overleve tørken og vokse lidt. Der var et betydeligt stærkere angreb af meldug end i 1988, og bekæmpelsen kunne kun påvises ved, at der produceredes færre meldugkonidier i parcellerne behandlet med *T. albescens* end i ubehandlede. Den største forskel i produktion af meldugkonidier fandtes i de vandede parceller, hvor der også målttes den største dækning med *T. albescens* (14%).

Resultaterne fra de to år viser, at hyppig nedbør eller vanding er en forudsætning for god bekæmpelse. På den baggrund må det konkluderes, at *T. albescens* kan overleve i det mikroklima, der forekommer i en tæt bestand af byg, men da vækst og en konstant høj dækningsgrad af *T. albescens* på bladene er nødvendig for bekæmpelse, vil den kun kunne sikres ved vanding. En praktisk anvendelse til markafgrøder vil derfor næppe kunne komme i betragtning.

Bekæmpelse af agurkemeldug

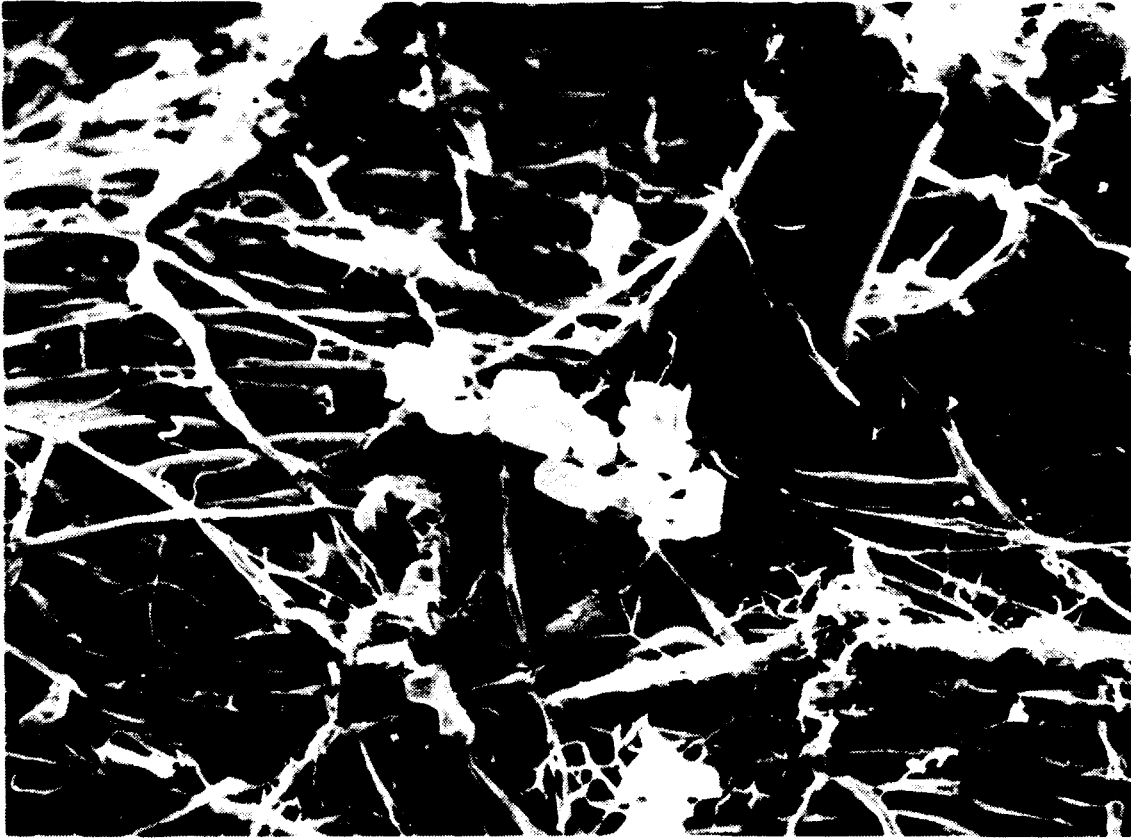
Forsøg med afklippede agurkeblade i plasticæsker med reguleret luftfugtighed viste - i overensstemmelse med bygforsøgene, - at *Tilletiopsis*-svampen kræver mere end 70% relativ luftfugtighed for at danne en stabil høj population på bladene. En luft-

fugtighed på 60% kan kun sikre svampens overlevelse.

Derefter blev der udført forsøg med agurkeplanter med 3-4 løvblade i plexiglaskamre med reguleret luftfugtighed (80-100%). Forsøgene havde til formål at klarlægge det optimale tidspunkt for sprøjtning med *T. albescens* i forhold til tidspunktet for meldugsmitten. Der blev opnået god bekæmpelse ved sprøjtning med *T. albescens* fra 3 dage før til 3 dage efter dagen for meldugsmitte. Det bedste tidspunkt for sprøjtning med antagonisten var 3 dage efter meldugsmitte, og den bedste bekæmpelse (>90%) blev opnået med to sprøjtninger med tre dages mellemrum. Bekæmpelsen viste sig ved en stærk reduktion af antallet af meldugkolonier på agurkebladene.

Forsøg med dyrkningsforhold svarende til dem i et væksthushartneri blev udført i et af Risøs væksthuse, hvor der kunne etableres en konstant høj luftfugtighed (>70%). Forsøget blev udført med et meget højt smittetryk. Melduggens udvikling på bladene samt dækningen med *Tilletiopsis* blev registreret ugentligt i 5 uger. Der viste sig hurtigt - som ved forsøgene i plexiglaskamre - en væsentlig lavere dækningsgrad og konidieproduktion af meldug på bladene af de *Tilletiopsis*-behandlede planter. Senere i forsøgsperioden og på de øvre blade, hvor *T. albescens* ikke var påført -og altså spontant smittet med både meldug og *Tilletiopsis*, var der kun en svag bekæmpelse.

Agurkeforsøgene tyder således på, at der kan opnås en god bekæmpelse af meldug under betingelser med høj luftfugtighed, forholdsvis lavt smittetryk, og med mulighed for gentagelse af behandlingen med *Tilletiopsis*, efterhånden som kulturen vokser. En praktisk anvendelse af metoden til agurkekulturer må derfor anses for realistisk.



Scanning elektronmikroskopi af agurkemeldug overvokset med de fine hyfer af *Tilletiopsis albescens*. Ballistosporer ses ved pile.

Undersøgelse af bekæmpelsesmekanismen

Det er konstateret, at *T. albescens* hæmmer meldugsvampens udvikling ved at reducere antallet og størrelsen af meldugkolonier og ved at formindske antallet af konidier, der dannes i kolonierne.

Ved benyttelse af lysmikroskopi og scanning elektronmikroskopi ses, at meldughyfer og -konidier overvokses af *T. albescens*, og at der efter en uges forløb tydeligvis er størst tæthed af *Tilletiopsis*-hyfer i nærheden af og på melduggen.

Sprøjtning med et filtrat af vækstsubstratet, fri for hyfer og konidier af *Tilletiopsis*, viste ingen bekæmpelse af meldug, og undersøgelser af meldugkonidiernes spiring med og uden påførsel af *T. albescens* viste ingen forskel i spiringsevne. Resultaterne fra disse to forsøg tyder på, at *T. albescens* ikke har antibiotisk virkning på meldugsvampen.

Krydspodninger på agar af *T. albescens* og saprofytter fra bladene fx *Sporobolomyces* sp. viste, at *T. albescens* klarer sig godt i konkurrencen med andre mikroorganismer på bladenes overflade.

Da melduggens cellevægge er bygget af kitin og 1,3- β -glucaner, må kitinase- og glucanase-aktivitet antages at være af væsentlig betydning for nedbrydningen af cellevæggene. Enzymundersøgelser tyder på, at *T. albescens* ikke har kitinaseaktivitet. Derimod er der i et essay med tritiummærket laminarin (1,3- β -glucan) påvist en betydelig glucanaseaktivitet både i *Tilletiopsis*-svampen og i det substrat, den har vokset på. Der må således være tale om extracellulær enzymaktivitet. Sammenholdes disse resultater med svampens vækst på meldugsvampene og resultaterne af bekæmpelsesforsøgene, bestyrker det sandsynligheden for, at der er tale om hyperparasitisme, sådan som det også er antaget af andre, og ikke om antibiose.

Afslutning

Forskningsprojektet er nu under afslutning, og der er ikke i øjeblikket planer om opfølgning af projektet her på Risø. Selv om målsætningen er nået i projektet, er der flere spørgsmål, som det kunne være værdifuldt at afklare, fx spørgsmålet om *T. albescens*'s næringsstofoptagelse, om hyperparasitismen er specifik for meldug, og om det er muligt at formulere svampen i en rimelig holdbar handelsvare. Disse spørgsmål må afklares, før man kan gøre sig håb om en fornuftig praktisk anvendelse.

Title and author(s) Agricultural Research Department Annual Report 1989 (in Danish)	Date January 1990
	Department or group Agricultural Research Department
	Groups own registration number(s)
	Project/contract no.
Pages 39 Tables Illustrations 10 References	ISBN 87-550-1619-7

Abstract (Max. 2000 char.)

The annual report gives a general review of the research work of the department. The activities of the year are described in short project reports followed by a list of publications, posters and lectures. Further, the report gives three review articles on selected subjects related to the work: "Chitinase in barley and rape seed", "Symbiotic nitrogen fixation" and "Biological control of powdery mildews". Included in the report are also a list of the staff members, guest scientists and students, lectures given at the department, and a list of travel- and other activities.

Descriptors

Barley; Bibliographies; Cell Cultures; Disease Resistance; DNA Sequencing; Genetic Engineering; Genetic Mapping; Mildew; Molecular Biology; Mutants; Nitrogen Fixation; Peas; Plant Breeding; Progress Report; Research Programs; Riso National Laboratory

**Rekvireres fra
Risø Bibliotek
Forskningscenter Risø,
Postbox 49, 4000 Roskilde, Danmark
Telefon 42 37 12 12, lokal 2268/2269
Telex 43116, Telefax 46 75 56 27**

**ISBN 87-550-1619-7
ISSN 0418-6435
ISSN 0903-7829**